True Confocal Scanner
Leica TCS SP2

Manuale utente

Indice

Informazioni generali

Utilizzo del manuale

A proposito del manuale
Questo manuale è stato concepito sia come tutorial, sia come manuale di riferimento per il Leica TCS SP2, ed è rivolto tanto all'utente non esperto, quanto a quello esperto. Nel caso non si abbia ancora alcuna dimestichezza con questo apparecchio, si consiglia di iniziare con il capitolo "Lavorare con il software LCS", di utilizzare il software per un certo tempo, e quindi di leggere i capitoli restanti del manuale. Gli utenti esperti possono scorrere i capitoli, il sommario e l'indice, nel caso desiderino chiarimenti su un determinato argomento.
Questo manuale illustra inoltre come interagiscono il Leica Confocal Software e il microscopio Leica.
Come utilizzare questo manuale
Si raccomanda non solo di leggere questo manuale, ma anche di utilizzarlo come libretto di servizio. È inoltre possibile impiegarlo come tutorial, per prendere confidenza con il Leica Confocal Software. Esso illustra una serie completa di funzioni e la loro esecuzione. Si consiglia di studiare le istruzioni passo dopo passo, in modo da ottenere il maggior successo possibile nell'apprendimento. Le istruzioni riguardanti l'esecuzione di determinate funzioni sono rese riconoscibili in questo manuale con un altro titolo.
Esecuzione di funzioni
Dopo il titolo introduttivo, viene illustrato il procedimento per l'esecuzione della funzione desiderata (tramite istruzioni passo-passo), oppure vengono mostrate diverse opzioni fra le quali è possibile scegliere:
1. I capitoli numerati come questo contengono istruzioni passo-passo, che vanno seguite per apprendere le modalità di funzionamento dei tools (Strumenti).
2. Quando diversi comandi menu vanno selezionati di seguito, fra i singoli comandi menu appare una freccia: ***File→ Save*** significa, ad esempio, che occorre fare clic su File e selezionare l'opzione Save (Salva) nel menu a discesa indicato.

Di norma viene indicata una sequenza di passi. Eseguire il passo o i passi indicati per avviare la funzione o le funzioni desiderate.
Si raccomanda di ripassare questo manuale ancora una volta, dopo che si sarà già utilizzato per un certo tempo il Leica ICM TCS SP2. Alla seconda lettura si incontreranno utili funzioni ignorate la prima volta.
Guida in linea
Il Leica TCS SP2 è dotato di un sistema di Guida contestualizzata che illustra le diverse funzioni del sistema.
È possibile cercare gli argomenti nel sommario della Guida in linea nel seguente modo:
Fare clic su ***Help → Contents.*** La Guida in linea viene richiamata e mostra il campo di dialogo CONTENTS (Contenuto). Questo campo di dialogo contiene il sommario in forma di albero di directory, che si può espandere o ridurre. Fare un doppio clic su una voce del sommario per indicare le informazioni corrispondenti.
È possibile cercare gli argomenti della guida tramite una parola chiave nel seguente modo:
Fare clic su ***Help →Index.*** La Guida in linea viene richiamata e mostra il campo di dialogo INDEX (Indice). Inserire il termine che si desidera cercare. La Guida in linea mostra la parola chiave che più si avvicina al termine indicato.
È possibile cercare gli argomenti della guida con la ricerca a tutto testo nel seguente modo:
Fare clic su ***Help →Search.*** La Guida in linea viene richiamata e mostra il campo di dialogo SEARCH (Cerca). Inserire il termine o l'espressione che si desidera cercare e fare clic sul pulsante LIST TOPICS (Mostra argomenti). Viene ora mostrata una lista degli argomenti suddivisa gerarchicamente. A destra, accanto al campo in cui è stato inserito il termine o l'espressione, si trova un menu in cui è possibile eseguire la ricerca a tutto testo utilizzando operatori booleani.

Concetti e simboli grafici

Tasto
I tasti sono i pulsanti presenti sull'interfaccia di comando del Leica Confocal Software. I tasti hanno un'icona e/o una identificazione in inglese (spesso abbreviata). Essi attivano direttamente un'azione o aprono una finestra di dialogo.

Menu
Per menu si intendono le categorie File, View (visualizza), Macro, Tools (strumenti), Window (finestra) e Help (guida) che vengono visualizzate nella cosiddetta riga di menu sul margine superiore dell'interfaccia di comando.

Opzione
Con opzioni si definiscono le possibilità di selezione ordinate gerarchicamente nei vari menu. Le opzioni attivano direttamente un'azione o aprono una finestra di dialogo.

Finestra di dialogo
Sia i tasti che le opzioni aprono finestre di dialogo. Nelle finestre di dialogo si possono impostare diversi parametri o selezionare funzioni.

Registro
I registri si trovano nelle finestre di dialogo. I registri ordinano tematicamente i parametri e le funzioni impostabili in una finestra di dialogo. Alcuni registri sono partizionati in campi.

Finestra di visualizzazione
Nel Leica Confocal Software vi sono due tipi di finestre di visualizzazione: La finestra di visualizzazione Viewer (Visualizzatore) viene richiamata con il tasto New (Nuova), e mostre le immagini riprese. Nella finestra di visualizzazione Experiment
Overview (panoramica esperimento) le immagini riprese vengono rappresentate in un albero di directory. Questa finestra di visualizzazione viene chiamata nel menu View e compare come una finestra separata sul margine sinistro dell'interfaccia di comando.

Legenda
Nel Leica Confocal Software sono presenti due legende in cui vengono visualizzati i parametri e le impostazioni di una ripresa. La legenda Experiment (Esperimento) può essere visualizzata sul margine destro della finestra di visualizzazione Viewer. La legenda Hardware si attiva nel menu View e compare come finestra separata sul margine destro dell'interfaccia di comando.

Menu contestuale
I menu contestuali compaiono azionando il tasto destro del mouse su determinati campi dell'interfaccia di comando. In questi menu contestuali vengono suggeriti diversi comandi legati al contesto.

Novità in questa versione del manuale

- Impostazione di luminosità, contrasto e correzione di gamma
  (Capitolo Elaborazione dati, pagina 227)
- Livellamento e filtraggio di riprese di superficie (opzionale)
  (Capitolo Elaborazione dati, pagina 232)
- Identificare e separare di segnali fluorescenti in sovrapposizione
  (Capitolo Elaborazione dati, pagina 232)
- Segmentazione di strutture immagini (opzionale)
  (Capitolo Elaborazione dati, pagina 299)
- Gestire i moduli dello stativo per microscopio dal software
  (Capitolo Funzioni di acquisizione dati, pagina 145)
- Importare ed esportare spettri di colorante
  (Capitolo Funzioni di acquisizione dati, pagina 161)
- Selezionare l'attuatore Z
  (Capitolo Funzioni di acquisizione dati, pagina 181)
- Rappresentazione grafica dei valori di misura di una misurazione on line
  (Capitolo Funzioni di presentazione dati, pagina 190)
- Descrizioni aggiornate di procedimenti di lavoro ed esercizi
  (Capitolo Modalità procedurali ed esercizi di procedure scelte, pagina 65)

Creazione di immagini confocali

Che cos'è la microscopia confocale?

In progetto sin dal 1953, la microscopia a scansione laser confocale si è sviluppata sino a diventare una tecnica largamente utilizzata in ambito pratico solamente negli ultimi 10 anni. Attualmente, essa viene utilizzata soprattutto nella ricerca biologica, nelle analisi chimiche e nella verifica dei materiali. Un apparecchio di questo tipo riunisce al suo interno i risultati di una ricerca e di uno sviluppo pluriennali in molti ambiti differenti: microscopia, tecnologia laser e ottica per luce coerente, videotecnologia, elettronica e tecnologia dei computer.
Nella microscopia confocale le strutture vengono riconosciute in quanto la luce emessa o riflessa da un campione, da un unico piano focale, viene concentrata, e la luce non proveniente da questo piano viene soppressa.
In uno scanner confocale a punti, le lenti del microscopio focalizzano la luce laser su un singolo punto del campione (il **punto focale**). Il laser scandisce ora il campione punto per punto, creando in tale modo l'immagine da acquisire. La luce a fluorescenza e la luce riflessa del campione vengono direzionate attraverso l'obiettivo.
Il microscopio e il sistema ottico del modulo di scansione focalizzano la luce emessa dal punto focale su un secondo punto, il **punto confocale**. Attraverso la minuscola apertura che si trova sul punto confocale (il cosiddetto pinhole, o foro stenopeico), la luce può arrivare dal punto focale al rivelatore. La luce extrafocale non arriva attraverso l'apertura.
Il principio confocale viene rappresentato schematicamente per la microscopia a epifluorescenza. Come nei microscopi a epifluorescenza convenzionali, una lente viene utilizzata sia come condensatore, sia come obiettivo. In questo modo viene meno la necessità di equilibrare esattamente fra loro due lenti e allinearle insieme. Un raggio laser collimato e polarizzato, condotto attraverso un'apertura, viene riflesso da un divisore del fascio (uno specchio dicroico) nella parte posteriore della lente dell'obiettivo, e focalizzato sul campione. A sua volta la luce riflessa dal campione passa attraverso questa lente. Il raggio luminoso viene focalizzato attraverso il foro stenopeico (cioè l'apertura confocale), per sopprimere in tale modo tutta la luce extrafocale, vale a dire la luce che viene emessa da altre zone del campione, al di sotto o al di sopra del piano focale. Il volume delle sezioni ottiche dipende da diversi parametri, come dal diametro (variabile) dell'apertura e dalla lunghezza d'onda. I dati intrafocali di ciascun punto sul campione vengono registrati da un rivelatore fotosensibile (p. es. un fotodiodo) disposto dietro l'apertura confocale. Il segnale di uscita analogico viene digitalizzato e trasmesso a un computer.
Per quanto riguarda il rivelatore, si tratta di un rivelatore a punti che riceve soltanto la luce di un punto preciso del campione. Per questo motivo, con il microscopio confocale - al contrario del microscopio convenzionale, con cui si analizza una zona più ampia del campione - in un dato momento, può essere osservato sempre e soltanto un singolo punto. Un'immagine intera del campione risulta quindi soltanto dalla sua scansione puntuale, per cui viene spostato il fuoco o il campione stesso. Entrambe queste possibilità hanno portato allo sviluppo di due tipi differenti di microscopi confocali:
Microscopi con tavola portaoggetto mobile: la tavola portaoggetto con il campione viene fatta avanzare di un passo dopo la preparazione di ogni ripresa, mentre il sistema ottico, durante questa scansione, resta fermo.
Microscopi con tecnica a emissione o a riflessione: il fuoco si sposta sopra il campione fermo e lo scandisce punto per punto con l'ausilio di specchietti piccoli e veloci azionati da galvanometri, come quelli utilizzati da LEICA.
Il sistema LEICA TCS SP2 rende possibile fotografare un singolo piano focale, come anche un'intera serie di piani, orizzontali o verticali. Una singola sezione verticale, o una scansione xz, consente una vista laterale del campione.
Il raggruppamento di una sequenza di sezioni ottiche attraverso il campione in una pila d'immagini e la susseguente elaborazione digitale hanno il pregio di rendere possibile, a partire da questo set di dati pluridimensionale, sia la creazione di un'immagine bidimensionale calcolata (proiezione), sia la produzione di una rappresentazione tridimensionale rimpicciolita del campione su un computer adeguato.
Potere risolvente ottico
Il termine "risoluzione" si riferisce alla capacità di distinguere i dettagli più fini di una struttura. In un microscopio ideale, il sistema ottico dovrebbe essere totalmente esente da qualsiasi tipo di aberrazione. In un tale ipotetico strumento, il potere risolvente verrebbe limitato solamente dalla

diffrazione. Questo concetto si può definire come la distanza minore fra due punti di un campione a cui essi possano ancora essere visti come due punti separati (Criterio di Rayleigh). Superata detta soglia, i due punti si confondono fra loro (ossia i loro dischi di diffrazione si sovrappongono totalmente o parzialmente), e non possono più essere riconosciuti come due punti diversi fra loro. È possibile calcolare detta distanza a partire dalla grandezza dell'immagine di diffrazione di un punto infinitamente piccolo del campione. Esso corrisponde al raggio del primo minimo in detta immagine di diffrazione. Ciò è inoltre correlato alle aperture numeriche dell'obiettivo e del condensatore. L'apertura numerica viene definita dall'indice di rifrazione della lente e dalla grandezza del cono luminoso che può penetrare.
Analogamente all'argomentazione di cui sopra, la risoluzione assiale può essere definita come il raggio del primo minimo lungo l'asse microscopico dell'immagine di diffrazione di un oggetto puntiforme. Corrispondentemente alla teoria su simili immagini di diffrazione tridimensionali, il potere risolvente ottico lungo l'asse z è inferiore del fattore 2 rispetto al potere risolvente ottico laterale. La risoluzione ottica lungo l'asse z ammonta perciò a circa la metà della risoluzione all'interno del piano focale.
Per quanto riguarda il microscopio Leica TCS SP2, si tratta di un vero e proprio sistema a scansione puntuale ad elevatissima sensibilità e risoluzione teorica x, y e z, che non ammette compromessi.
La risoluzione di scansione si riferisce alla nitidezza dell'immagine, che viene stabilita tramite numero e dimensioni dei pixel. Quanto maggiori sono il numero di pixel e il formato di scansione selezionati, tanto più facilmente potranno essere distinti due oggetti vicini fra loro. La risoluzione di scansione è limitata al massimo potere risolvente ottico.

Rilevamento

La formazione confocale di un'immagine, o più precisamente la misurazione delle caratteristiche ottiche di quantità molto piccole di un campione, non viene limitata solamente dalla qualità ottica del microscopio. Altre limitazioni sono costituite dai seguenti fattori:
- Campioni continui vengono misurati soltanto in quantità di campionamento piccole e distinte (a causa della campionatura e dell'elaborazione digitale).
- L'esattezza con cui tali piccole quantità sono definite viene determinata tramite il meccanismo di scansione.
- L'intensità della sorgente luminosa in relazione al potere riflettente del campione.
- La sensibilità ed il rumore del rivelatore.

Anche il rivelatore è una componente centrale nel microscopio confocale. A causa del loro rapporto segnale/rumore molto elevato, LEICA Microsystems impiega come rivelatori gli Heidelberg Photomultiplier.

Trattamento delle immagini

Nei primi microscopi confocali, il rivelatore era collegato a un oscilloscopio con fosforo a luminescenza residua, e l'immagine veniva mostrata così com'era stata scansita. Negli apparecchi attuali, il segnale viene dapprima elaborato digitalmente, quindi registrato da un computer. Grazie a ciò, al giorno d'oggi vi è la possibilità di modificare in vari modi l'immagine mostrata. Vi sono le seguenti possibilità:
- Intensificazione dei contrasti tramite valori soglia, allungamento lineare del contrasto e correzione gamma (andamento curvilineo del valore d'intensità dell'immagine vs. rappresentazione grafica dell'intensità di sorgente).
- Doppia esposizione di immagini in esperimenti.
- Filtrazione digitale per l'ingrandimento di angoli o per livellamento, schermatura ecc.
- Ricostruzione di viste tridimensionali con l'ausilio di sezioni ottiche raggruppate in pile di immagini.

Ciò permette, ad esempio, la ricostruzione di un'immagine di un piano xz a partire da pile di immagini di piani xy. Inoltre, possono essere prodotti e analizzati da ogni direzione possibile modelli tridimensionali completi del campione.
- Composizione di filmati digitali a partire dalle serie temporali fotografate al microscopio.
- Quantizzazione e misurazioni

Questo tipo di trattamento delle immagini non incrementa la qualità dei dati raccolti; esso serve però a migliorare la vista, e a semplificare l'interpretazione qualitativa dei dati.

Sorgente luminosa

I laser sono estremamente adatti come sorgenti di luce nella microscopia confocale, dal momento che essi emettono una luce molto intensa con un raggio caratterizzato da uno scostamento ridotto. Essi sono inoltre molto semplici da focalizzare e stabili nella loro intensità. Questa stabilità è fondamentale in caso di misurazioni quantitative.

Integrazione
Il Leica TCS SP2 è stato concepito come sistema integrato. Tutti gli elementi ottici e meccanici lavorano in perfetta sintonia con l'hardware e il software del computer. Il corrispondente Leica Confocal Software supporta l'intero processo della produzione dell'immagine, iniziando dal sezionamento ottico, passando per l'elaborazione e l'analisi delle immagini (l'applicazione principale del software), sino alla stampa dell'immagine con l'ausilio di una stampante.

Aiuto tramite Internet

In caso di problemi, si prega di rivolgersi dapprima alla propria filiale Leica, o al proprio locale rivenditore di fiducia Leica.
Nel caso si desiderino informazioni su Leica Microsystems Heidelberg GmbH e sulla microscopia confocale, è possibile ottenerle nel nostro sito web, all'indirizzo
http://www.confocal-microscopy.com
Oppure inviando una e-mail a llt.support@leica-microsystems.com.

Avvertenze legali

DIRITTI DI PROPRIETÀ
I dati contenuti in questo documento sono proprietà di Leica Microsystems Heidelberg GmbH, e sono esclusivamente a disposizione dei clienti di detta azienda per la loro sicurezza, così come per un esercizio efficiente e per la corretta manutenzione del prodotto qui descritto. L'utilizzo o la trasmissione di dati di proprietà di Leica Microsystems Heidelberg GmbH a scopo di utilizzo per la produzione o riproduzione del prodotto qui descritto o di un prodotto simile è proibito, e la consegna di questo documento non rappresenta inoltre in alcun modo una licenza o autorizzazione implicita.

VARIAZIONI E MODIFICHE
Leica Microsystems Heidelberg GmbH si riserva il diritto di elaborare questo documento e/o di sviluppare ulteriormente e migliorare i prodotti qui descritti in qualsiasi momento e senza preavviso o altro obbligo. Le informazioni e le specifiche tecniche di questo manuale possono essere modificate in ogni momento e senza preavviso.

GARANZIA
Leica Microsystems Heidelberg GmbH mette a disposizione questa pubblicazione senza garanzia di completezza e senza alcuna garanzia di tale genere, né esplicita né implicita, inclusa, ma non limitatamente ad essa, l'implicita garanzia di commerciabilità o dell'idoneità a un dato scopo. Nella produzione di questo documento sono state prese tutte le opportune misure di sicurezza, inclusa l'esecuzione di una verifica degli aspetti tecnici e non tecnici. Leica Microsystems Heidelberg GmbH non fornisce alcuna garanzia per eventuali errori od omissioni. Leica Microsystems Heidelberg GmbH non è altresì responsabile per danni diretti, casuali o ulteriori, che potrebbero verificarsi a causa dell'utilizzo del materiale contenuto in questo documento.

MARCHI DI FABBRICA RISERVATI
In questo manuale vengono nominati marchi riservati. In luogo dell'esposizione di un simbolo di marchio riservato (™) accanto a ogni marchio riservato nominato, si chiarisce in questa sede che detti nomi vengono utilizzati esclusivamente a scopo redazionale, e - a beneficio del titolare del marchio - senza intenzione di ledere i diritti del marchio di fabbrica.

SICUREZZA

I termini utilizzati relativi alla classe di sicurezza laser si riferiscono alla normativa EN 60825-1. Per l'ambito di validità della CDRH, la classe laser 4 va sostituita nel testo con IV, la classe laser 3B con IIIB, la classe laser 3A con IIIA, la classe laser 2 con II e la classe laser 1 con I.

Questo apparecchio è stato concepito e prodotto in conformità alle vigenti norme di potenza per prodotti a laser di classe 3B, come definite dalle norme e prescrizioni USHHS CDRH/FDA, OSHA ed EN, di validità nota al momento della produzione.
Dal momento che non può essere prevista ogni possibile situazione di pericolo, nell'installazione, utilizzo e manutenzione del prodotto, spetta all'utente comportarsi con attenzione e buonsenso, e prendere tutte le opportune misure di sicurezza valide per i laser di classe 3B, così come per le

apparecchiature elettriche ad alta tensione.
Non è consigliabile discostarsi dalle procedure di funzionamento e manutenzione pubblicate. Ogni difformità dalle procedure di funzionamento e manutenzione indicate va a esclusivo rischio dell'utente.

LICENZA SOFTWARE
Il software descritto in questo documento è soggetto a un accordo di licenza incluso nel prodotto. Tale accordo illustra sotto quali condizioni l'utilizzo del prodotto è consentito o proibito.

Prescrizioni di sicurezza

Il capitolo seguente illustra le misure di sicurezza standard, gli avvisi e le prescrizioni di sicurezza.

Istruzioni di sicurezza generali
La sicurezza dell'utente sta al primo posto. Leggere quindi ed osservare tutti gli avvisi e le prescrizioni di sicurezza contenuti in questo manuale ed applicati sull'apparecchio, prima di mettere in funzione apparecchi Leica. La mancata osservanza degli avvisi e delle prescrizioni di sicurezza potrebbe comportare gravi lesioni e rilevanti danni materiali all'apparecchio e ai dati.

Assunzione di rischio per l'utilizzo degli apparecchi
L'utente o il proprietario del prodotto si assume il rischio per il funzionamento dell'apparecchio.
Il proprietario od operatore è pienamente responsabile per tutte le possibili conseguenze che possono verificarsi nel caso in cui l'apparecchio venga aperto da persone che non siano collaboratori autorizzati del Servizio Clienti Leica, nel caso in cui esso non venga sottoposto a corretta manutenzione o correttamente riparato, o nel caso esso venga impiegato per scopi differenti da quelli indicati nella documentazione di accompagnamento o nella Guida in linea. Leica Microsystems Heidelberg GmbH non risponde in alcun modo dei danni risultanti dalla mancata osservazione delle suddette informazioni. Le suddette informazioni non modificano in alcuna maniera, né implicita né esplicita, le clausole di garanzia e di responsabilità contenute nelle condizioni commerciali generali di Leica Microsystems Heidelberg GmbH.

Prescrizioni di avvertimento, prescrizioni di sicurezza ed avvisi
Le prescrizioni di avvertimento, le prescrizioni di sicurezza e le avvertenze contenuti in questo manuale sono contraddistinti come segue.

Un ***avviso*** *come questo richiama l'attenzione su una procedura di funzionamento, un processo, una condizione o un'istruzione da osservare ed a cui attenersi strettamente, in quanto in caso contrario vi è pericolo per la vita delle persone che lavorano con l'apparecchio.*

Una ***prescrizione di sicurezza*** *come questa richiama l'attenzione su una procedura di funzionamento, un processo, una condizione o un'istruzione da osservare ed a cui attenersi strettamente, in quanto in caso contrario possono verificarsi gravi danni materiali all'apparecchio o ai dati, o possono avere luogo perdite di dati.*

Gli note *contengono informazioni aggiuntive riguardo a un dato argomento, oppure istruzioni particolari per il maneggiamento del prodotto in una determinata condizione o in una serie di circostanze.*

Condizioni particolari del luogo d'installazione

Sebbene il rispetto dei valori di soglia riguardo all'emissione di radiazioni elettromagnetiche (EMC) da parte di questo apparecchio sia stato verificato, non può essere escluso un rischio residuale di influsso di altri apparecchi.

Questo apparecchio non può essere installato in un ambiente con apparecchiature elettromedicali utilizzate per il mantenimento in vita.

Il sistema confocale va pulito accuratamente prima di ogni variazione di posto. Lo stesso vale anche per lo smontaggio di parti. Ciò riguarda in particolare sistemi che si trovino in laboratori di ricerca medico-biologica.

Ciò è necessario per eliminare contaminazioni eventualmente presenti, evitando quindi propagazioni di sostanze ed agenti patogeni pericolosi, cosa che rappresenterebbe un pericolo per le persone. Prestare attenzione in questa fase non soltanto alle superfici, ma in particolare anche ai ventilatori e alle apparecchiature di raffreddamento, dato che in questi punti si accumula frequentemente polvere.

L'utilizzo dell'apparecchio per scopi differenti da quelli indicati, o l'apertura non autorizzata dell'apparecchio stesso, può comportare pericolo a causa della tensione elettrica e a causa dell'irraggiamento laser.

I termini utilizzati relativi alla classe di sicurezza laser si riferiscono alla normativa EN 60825-1. Per l'ambito di validità della CDRH, la classe laser 4 va sostituita nel testo con IV, la classe laser 3B con IIIB, la classe laser 3A con IIIA, la classe laser 2 con II e la classe laser 1 con I.

Classe laser

Questo apparecchio è stato concepito e prodotto in conformità alle vigenti norme di potenza per prodotti a laser di classe 3B, come definito dalle norme e prescrizioni USHHS, CDRH/FDA, OSHA, EN 60825-1 e dalle prescrizioni antinfortunistiche VBG 93, di validità nota al momento della produzione.

Dal momento che non tutte le situazioni di pericolo possono essere previste dal produttore, nell'installazione, utilizzo e manutenzione del prodotto spetta all'utente comportarsi con attenzione e buonsenso, e prendere tutte le opportune misure di sicurezza valide per i laser di classe 3B, così

come per le apparecchiature elettriche ad alta tensione. La mancata osservazione delle procedure di funzionamento e manutenzione indicate va ad esclusivo rischio dell'utente.
Il Leica TCS SP2 non è pericoloso, a patto che venga utilizzato conformemente alle istruzioni.

L'operatore è responsabile del rispetto delle norme di sicurezza in vigore. Per ragioni di sicurezza, la sosta nel raggio d'azione del laser è consentita esclusivamente al personale specializzato di servizio Leica.

Misure di sicurezza tecniche
In conformità alle disposizioni per la sicurezza dei laser, EN 60825 (normativa europea) e CDRH (normativa USA), Leica Microsystems Heidelberg GmbH ha preso diverse misure di sicurezza. Sono state applicate etichette di avvertimento a tutte le aperture ed a tutte le parti smontabili dalla quali può avere luogo l'uscita di luce laser.
Sono inoltre stati montati diversi **interruttori di sicurezza laser**.

Osservare la prescrizione della normativa EN 60825-1: "Sicurezza di apparecchiature laser, Parte 1. Classificazione apparecchi, requisiti e manuale utente", secondo cui, per installazioni in cui vengano utilizzati apparecchi di classe 3B, va nominato un incaricato per la sicurezza dei laser (Laser Safety Officer), oppure un Laser Protection Advisor (consulente per protezione laser). Ricade nella responsabilità dell'operatore stabilire ed elaborare adeguati controlli per l'impiego dell'apparecchio.

Non guardare mai direttamente in un raggio laser o in una riflessione del raggio stesso. Un'esposizione ad un raggio laser può danneggiare irreparabilmente la capacità visiva. Un raggio laser riflesso è altrettanto intenso di un raggio diretto.

L'utente è responsabile in qualsiasi momento del sicuro funzionamento e della giusta manutenzione di questo apparecchio. La classificazione come attrezzatura laser di classe 3B e l'adempimento delle prescrizioni di sicurezza elettrica sono quindi garantite soltanto quando tutti i dispositivi, le interdizioni e i sistemi di sicurezza per il bloccaggio del laser siano in ordine di servizio e in funzione. A dispositivi o sistemi di sicurezza disattivati o danneggiati, il personale potrebbe essere esposto ad irraggiamento di laser di classe 3B, sufficientemente intensi da causare gravi lesioni oculari, ustioni o danni materiali.

Qualsiasi intervento in uno dei sistemi di sicurezza e/o in una delle interdizioni di sicurezza e qualsiasi disattivazione di uno dei sistemi di sicurezza e/o di una delle interdizioni di sicurezza comporta il decadimento del diritto di garanzia.

Cavi di collegamento
Il set di cavi di collegamento incluso nell'estensione della fornitura dell'apparecchio è conforme ai requisiti del Paese in cui è stato acquistato l'apparecchio. Nel caso d'impiego dell'apparecchio in un

altro Paese, occorre utilizzare cavi di collegamento conformi ai requisiti del Paese in questione.

Il seguente cablaggio è prescritto dal produttore:
Il cavo di collegamento del microscopio va inserito nella striscia di prese a innesto compresa nella fornitura. Nel caso in cui venga utilizzata una lampada a mercurio ad alta pressione, essa va collegata a un allacciamento di rete separato. Ciò impedisce che essa venga continuamente inserita e disinserita insieme al calcolatore di comando ed all'elettronica di scansione, ed incrementa in tal modo la durata di vita della sorgente luminosa.

Questo apparecchio è stato concepito per il collegamento a una presa di corrente a massa. Il connettore di terra è un'importante funzione di sicurezza. Al fine di ridurre rischi quali folgorazioni o danni materiali, tale funzione non può essere disattivata.

Al fine di ridurre rischi come pericolo d'incendio e folgorazioni, questo apparecchio non può in alcun caso essere esposto a pioggia o all'umidità. Non aprire in alcun caso l'alloggiamento. L'intera manutenzione può essere eseguita esclusivamente da un tecnico autorizzato Leica.

Nessun tipo di liquido deve penetrare nell'alloggiamento dell'apparecchio, o entrare in contatto con i componenti elettrici dello stesso. L'apparecchio dev'essere perfettamente asciutto prima di essere collegato alla rete di alimentazione o di essere inserito.

Prescrizioni di sicurezza generali
In accordo con le disposizioni di sicurezza generali e quelle relative ad apparecchi laser, si raccomanda di osservare le seguenti istruzioni:

Prestare attenzione alle istruzioni per il funzionamento dell'apparecchio.
Utilizzare questo prodotto soltanto secondo le informazioni contenute in questo manuale e nella Guida in linea del Leica Confocal Software. Leggere per intero e accuratamente tutte le istruzioni per il funzionamento dell'apparecchio prima di avviare il sistema. Come preparazione alle singole fasi operative che occorrerà eseguire, si raccomanda dapprima di leggere sempre per intero la corrispondente descrizione della funzione nella Guida in linea, e soprattutto di osservare le prescrizioni di sicurezza riguardanti il maneggiamento del sistema. È possibile trovare una panoramica delle singole funzioni nel sommario della Guida in linea.

Utilizzare questo prodotto esclusivamente per gli scopi descritti in questo manuale e nella Guida in linea del Leica Confocal Software.
Il sistema è stato progettato per la produzione di immagini confocali a scansione laser e misurazioni quantitative nell'ambito della scienza dei materiali. Ogni impiego del TCS SP2 per altri scopi o in altre applicazioni è da ritenersi un utilizzo improprio e non ammesso. L'utente si assume pienamente il rischio per tutti gli esperimenti che verranno condotti con questo sistema e per le conseguenze che avranno luogo da detti esperimenti. Ciò vale soprattutto nel caso in cui l'apparecchio sia stato aperto o modificato dall'utente.

Attenersi alle istruzioni per la manutenzione.
A tale riguardo, si prega di leggere interamente il capitolo "Manutenzione e pulizia" in questo manuale.

Non eseguire sull'apparecchio alcun intervento che non sia descritto in questo manuale o nelle successive integrazioni del manuale stesso.
L'esecuzione di riparazioni e interventi di servizio è consentita esclusivamente ai tecnici autorizzati del Servizio Clienti Leica Microsystems Heidelberg GmbH.

Collegare al prodotto solamente apparecchiature elettriche menzionate in questa documentazione di accompagnamento. Non collegare in alcun caso il prodotto ad altre apparecchiature non menzionate in questa documentazione.
Prima di collegare il prodotto a qualsiasi apparecchiatura di questo tipo, si prega di rivolgersi alla propria agenzia di servizio locale Leica, o direttamente a Leica Microsystems Heidelberg GmbH.

Non utilizzare condensatori microscopici S70.
A causa della grande distanza di lavoro e della ridotta apertura numerica del condensatore S70, in caso di mancata osservazione delle prescrizioni di sicurezza (vedi "Prescrizioni di sicurezza particolari per gli utenti"), potrebbe verificarsi un carico di raggi laser di livello superiore a quello ammesso. Utilizzare perciò soltanto i condensatori Leica S1 ed S23.

Prescrizioni di sicurezza particolari per gli utenti
Leica Microsystems Heidelberg GmbH ha fatto tutto il possibile, tramite speciali misure, prese in conformità a diverse disposizioni precauzionali, per massimizzare la sicurezza dell'utente e minimizzare i rischi per la salute.
L'utente deve utilizzare il TCS SP2 in conformità alle istruzioni per garantire la propria sicurezza. Qui di seguito vengono elencati i seguenti, importanti punti:

Non sostituire in alcun caso gli obiettivi durante un processo di scansione
È possibile sostituire correttamente gli obiettivi in questo modo:
Accertarsi che la modalità scansione sia disinserita. Assicurarsi che non vi sia luce laser nel piano focale.
Ruotare la torretta portaobiettivi in modo tale che l'obiettivo da sostituire si trovi all'esterno dell'asse ottico e punti verso l'esterno. Procedere con attenzione e non fare forza sulla torretta portaobiettivi, dato che ciò può comportare ad una riduzione permanente della risoluzione negli scanner dell'obiettivo.
Avvitare il nuovo obiettivo e ruotare la torretta portaobiettivi, in modo che si trovi nuovamente all'interno dell'asse ottico.

Tutte le posizioni non utilizzate sulla torretta portaobiettivi vanno provviste di coperchio.

Non tenere mai oggetti nel percorso del raggio laser durante il procedimento di scansione.

Collocare regolarmente il campione nel fermacampioni.

Non sostituire mai il campione durante un processo di scansione.
È possibile sostituire correttamente il campione in questo modo:
Accertarsi che la modalità scansione sia disinserita. Assicurarsi che non vi sia luce laser nel piano focale. Chiudere lo sportellino di sicurezza sul tubo.
Sostituire ora il campione.

Sicurezza del laser
Il termine 'LASER' è una sigla composta da **L**ight **A**mplification by **S**timulated **E**mission of **R**adiation (amplificazione di luce mediante emissione stimolata di radiazioni). Il primo laser venne presentato nel 1960, e funzionava con un rubino come mezzo laser. Con il passare del tempo, l'impiego dei laser si è esteso a numerosissimi ambiti, dalla chirurgia alla lettura dei codici a barre alle casse dei supermercati, dai puntatori laser alle stampanti laser, fino ai CD.
I laser possono generare un raggio molto intenso e molto sottile - collimato - di radiazioni elettromagnetiche in un campo di lunghezza d'onda da 150 nm sino ad 1 mm. Detta radiazione appare normalmente in forma di una luce molto intensa. Dato che nel caso della luce laser non si tratta di un tipo di radiazione ionizzata, l'interazione con la materia avviene normalmente in superficie. L'occhio e la pelle sono organi che reagiscono con grande sensibilità se esposti ad irraggiamento

laser. Gli effetti dei raggi laser su questi due organi variano a seconda delle situazioni, e dipendono dal tipo di laser, vale a dire dalla lunghezza d'onda della radiazione, e dalla potenza del raggio. Un'energia laser di una data lunghezza d'onda e potenza può essere messa a fuoco dal cristallino dell'occhio sulla retina, e comportare in quel punto lesioni gravi e irreparabili. Quando la potenza della radiazione laser è sufficientemente elevata, nel caso in cui gli arti o altre parti del corpo vengano esposte al raggio laser, possono verificarsi ustioni alla pelle. La tabella seguente riassume i diversi campi dello spettro elettromagnetico prodotto dai laser e indica quali organi sono messi a rischio dal contatto con il raggio laser.

Campo spettrale	Lunghezza d'onda	Organo interessato
	UV-C da 100 nm a 280 nm	Completamente assorbita dalla cornea e dalla congiuntiva
Ultravioletto	UV-B da 280 nm a 320 nm	Quasi completamente assorbita dalla cornea e dalla congiuntiva
	UV-A da 320 nm a 380 nm	Cristallino (offuscamento del cristallino)
Visibile	da 380 nm a 760 nm	Retina
	IR-A da 760 nm a 1400 nm	Retina, cristallino, pelle
Infrarosso	IR-B da 1400 nm a 3000 nm	Cornea e pelle
	IR-C da 3000 nm a 10^6 nm	Cornea e pelle

I laser vengono spesso contrassegnati secondo il tipo del mezzo laser. La suddivisione in classi di pericolosità laser ha luogo in base alla lunghezza o alle lunghezze d'onda, alla durata massima dell'irraggiamento e alla potenza media del laser.

Classi di pericolosità laser

Occorre comunque evitare di rivolgere lo sguardo direttamente nel raggio laser, indipendentemente da quale tipo di laser si tratti e per quanto bassa possa essere la potenza del laser.

Classe 1
Laser innocui (prevalentemente in costruzione chiusa).
Classe 2
Laser visibili di bassa potenza, che a causa del riflesso di protezione della palpebra sono normalmente innocui, purché non si guardi direttamente nel raggio laser.
Classe 3A
Laser normalmente innocui nel caso si rivolga lo sguardo per un breve tempo nel raggio; nel caso in cui venga utilizzata un'ottica a condensatore questo tipo di laser può rappresentare un pericolo.
Classe 3B
Laser che possono causare lesioni oculari in caso si rivolga lo sguardo nel raggio diretto o nel raggio riflesso specularmente.
Classe 4
Laser che possono causare lesioni oculari o ustioni cutanee nel caso si rivolga lo sguardo direttamente nel raggio, nel raggio riflesso specularmente o nella riflessione diffusa (dispersione). È possibile il rischio d'incendio.

Sistemi in costruzione chiusa
Le attrezzature laser o i sistemi laser delle classi 2, 3A, 3B o 4 sistemate in un alloggiamento di protezione e limitate nelle potenzialità di funzione possono essere inserite in una classe inferiore. Per mantenere detta classificazione di categoria inferiore possono essere necessarie speciali misure di controllo.

Pericoli risultanti dai laser
I pericoli che possono risultare da attrezzature laser si possono suddividere nei seguenti gruppi

principali:

1. Lesioni oculari, p. es. bruciature della retina o della cornea.

LE LESIONI DELLA RETINA SONO IRREPARABILI

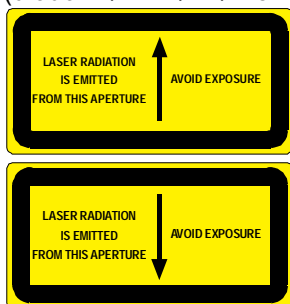
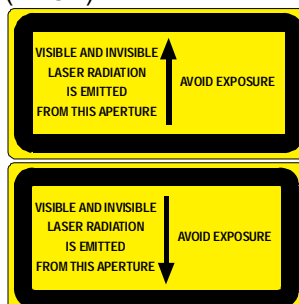
2. Lesioni cutanee, p. es. ustioni.
3. Pericoli di carattere elettrico, risultanti da apparecchiature ad alta tensione.
4. Pericoli d'incendio e di esplosione.

Specifiche della radiazione laser utilizzata

Tipo laser	Lunghezza d'onda [nm]	Potenza luminosa massima all'uscita laser [mW]	Potenza luminosa nel piano focale [mW]	Durata dell'impulso
Ar-UV	351, 364	< 50	< 2,5	onda continua (non pulsata, tratto permanente)
Diodo	405	< 25	< 4	onda continua (non pulsata, tratto permanente)
Diodo	430	< 10	< 4	onda continua (non pulsata, tratto permanente)
HeCd	442	< 30	< 3	onda continua (non pulsata, tratto permanente)
ArKr	488, 568, 647	< 125	< 10	onda continua (non pulsata, tratto permanente)
Ar	458, 476, 488, 514	< 200	< 50	onda continua (non pulsata, tratto permanente)
HeNe	543	< 1,5	< 0,5	onda continua (non pulsata, tratto permanente)
Kr	568	< 25	< 5	onda continua (non pulsata, tratto permanente)
HeNe	594	< 3	< 1	onda continua (non pulsata, tratto permanente)
HeNe	633	< 15	< 4	onda continua (non pulsata, tratto permanente)

Vengono utilizzati i seguenti contrassegni di sicurezza laser:

1. a tutte le aperture dalle quali può fuoriuscire luce

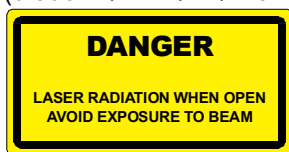
Per laser che emettono nel campo spettrale visibile
(diodo Ar/ ArKr/ Kr/ HeNe/ HeCd)

Per laser che emettono nel campo spettrale ultravioletto
(Ar-UV)

2. a tutte le parti dell'alloggiamento che possono essere aperte per mezzo di attrezzi, e dalle quali possono fuoriuscire irraggiamenti laser

Per laser che emettono nel campo spettrale visibile

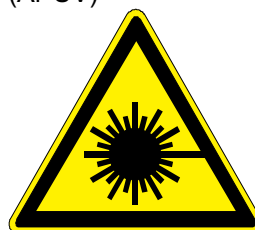
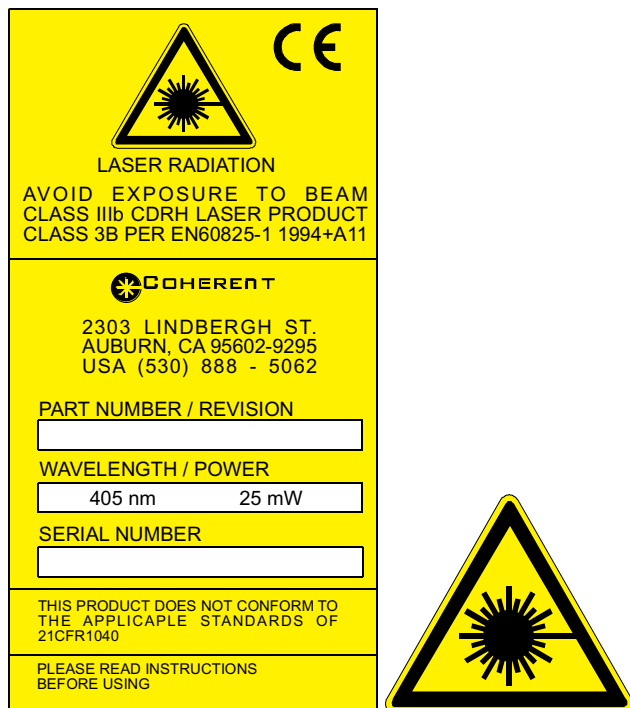
Per laser che emettono nel campo spettrale ultravioletto

(diodo Ar/ ArKr/ Kr/ HeNe/ HeCd)

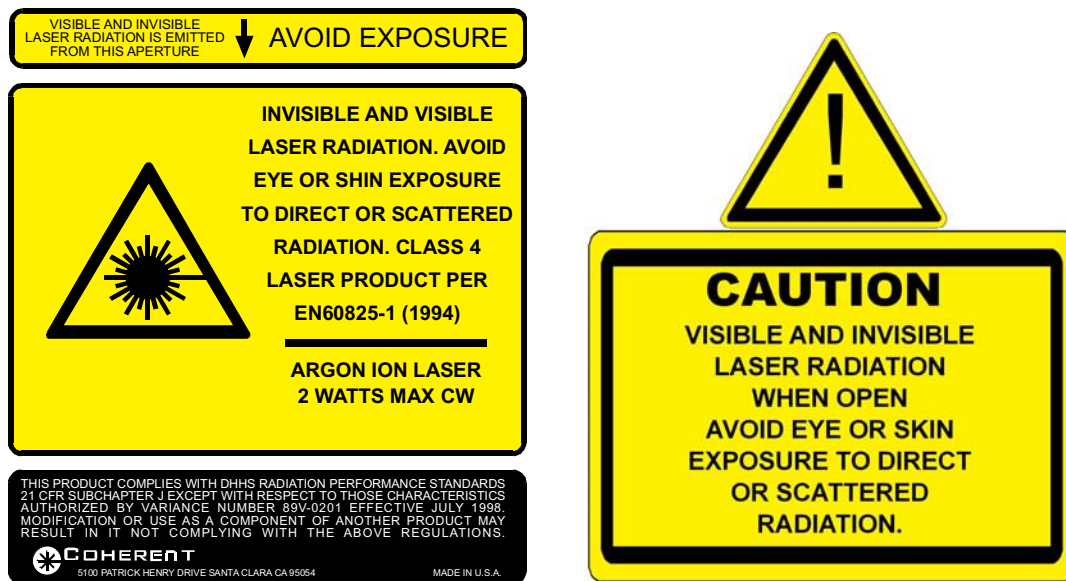
(Ar-UV)

DANGER
VISIBLE AND INVISIBLE
LASER RADIATION WHEN OPEN
AVOID EXPOSURE TO BEAM

3. sul coperchio dell'unità di alimentazione

Per laser che emettono nel campo spettrale visibile
(diodo Ar/ ArKr/ Kr/ HeNe/ HeCd)

Per laser che emettono nel campo spettrale ultravioletto
(Ar-UV)

Su un laser a diodi esterno da 405 nm (opzionale / in sostituzione di UV):

Applicazione sul laser:

Sebbene la radiazione del laser da 405 nm non si collochi propriamente nel campo spettrale visibile, esso va considerato come un laser UV. I sistemi confocali che vengono utilizzati con un laser UV o con un laser da 405 nm dispongono di una speciale ottica microscopica. Per questa ragione l'equipaggiamento di un sistema confocale che sia stato concepito per il campo spettrale visibile con un laser UV o con un laser da 405 nm non è assolutamente possibile.

Su un laser UV (opzionale):

Applicazione sul laser:

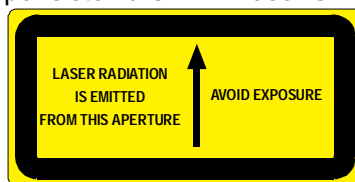
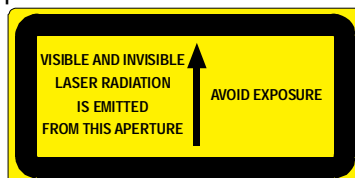
I sistemi confocali che vengono utilizzati con un laser UV dispongono di una speciale ottica microscopica. Per questa ragione l'equipaggiamento di un sistema confocale che sia stato concepito per il campo spettrale visibile con un laser UV non è assolutamente possibile.

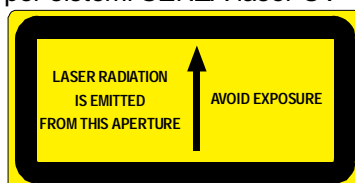
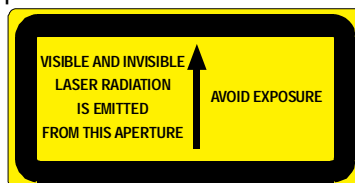
Posizione dei contrassegni di sicurezza laser

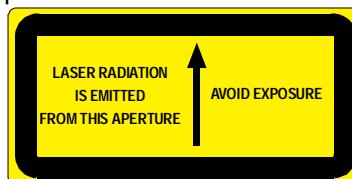
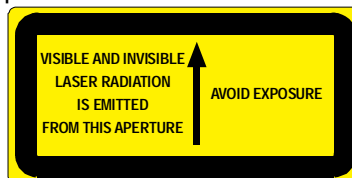
1. Microscopio inverso

La posizione 1 e la posizione 2 segnalano i punti di applicazione dei contrassegni di sicurezza laser sullo stativo del microscopio inverso.

Posizione 1

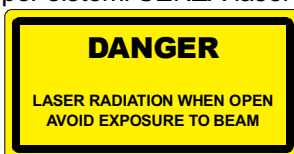
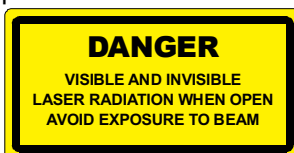
per sistema SENZA laser UV

per sistemi CON laser UV

Posizione 2

per sistemi SENZA laser UV

per sistemi CON laser UV

2. Microscopio verticale

La posizione 1 e la posizione 2 segnalano i punti di applicazione dei contrassegni di sicurezza laser sullo stativo del microscopio verticale.

Posizione 1

Posizione 2

3. Testina di scansione

La posizione 1 e la posizione 2 segnalano i punti di applicazione dei contrassegni di sicurezza laser sulla testina di scansione.

Posizioni 1 e 2 per sistemi SENZA laser UV

Posizioni 1 e 2 per sistemi CON laser UV

4. Unità di alimentazione (coperchio)

Posizione 1 per sistemi con laser HeNe

DANGER

LASER RADIATION WHEN OPEN
AVOID EXPOSURE TO BEAM

per sistemi con laser ArKr

per sistemi con laser Ar

LASER RADIATION
AVOID DIRECT EXPOSURE TO BEAM
< 400 mW ArKr 457-675 nm
CLASS IIIb LASER PRODUCT

per sistemi con laser Kr

LASER RADIATION
AVOID DIRECT EXPOSURE TO BEAM
< 400 mW ARGON 457-514 nm
CLASS IIIb LASER PRODUCT

per sistemi con laser HeNe, laser Ar e laser Kr

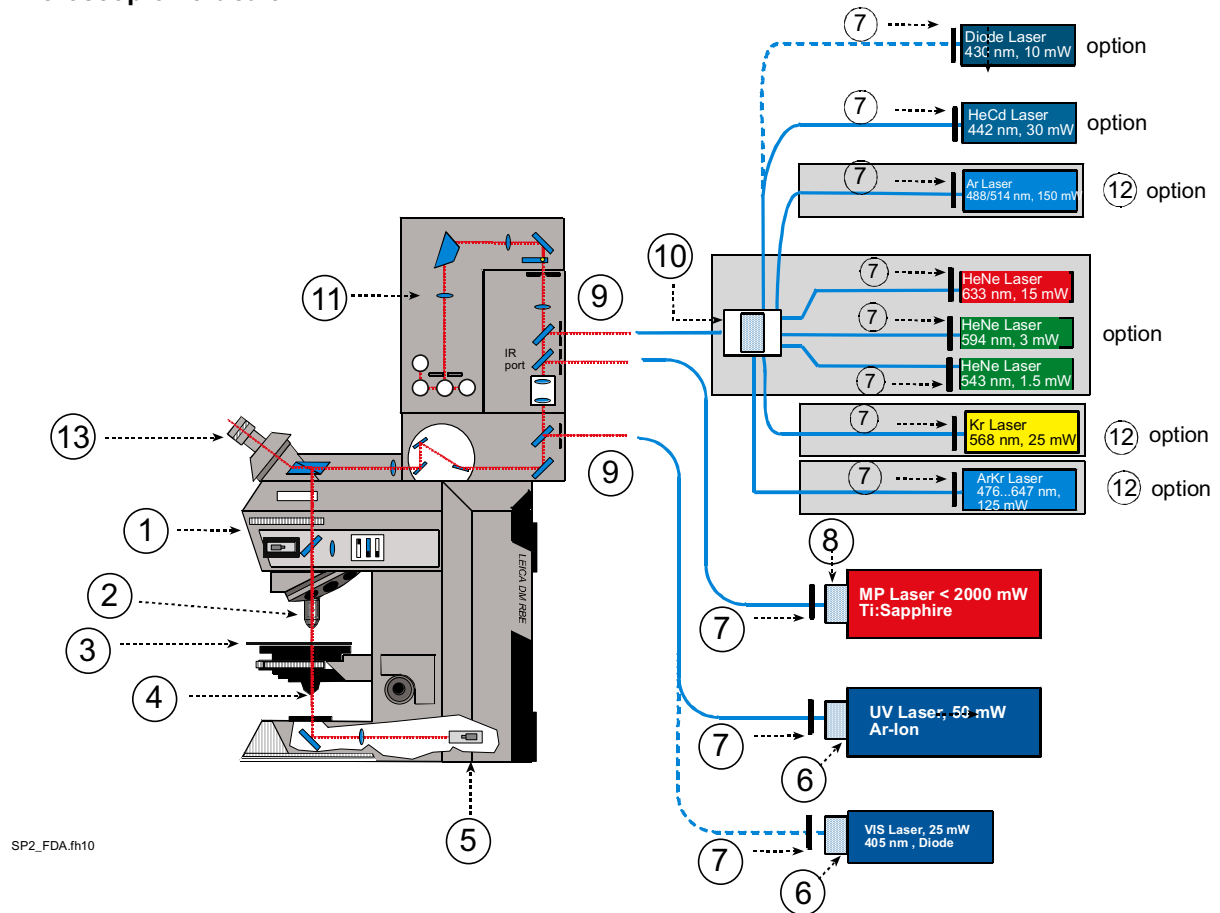
LASER RADIATION
AVOID DIRECT EXPOSURE TO BEAM
< 400 mW KRYPTON 568 nm
CLASS IIIb LASER PRODUCT

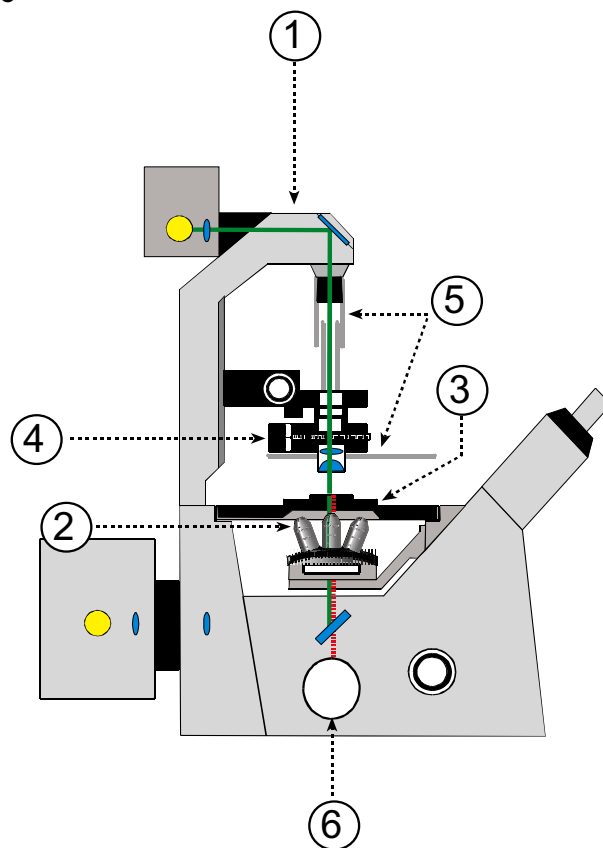
per sistemi con laser HeNe, laser HeCd, laser Ar e laser Kr

LASER RADIATION
AVOID DIRECT EXPOSURE TO BEAM
< 500 mW Ar-Kr-HeNe 457-633 nm
CLASS IIIb LASER PRODUCT

LASER RADIATION
AVOID DIRECT EXPOSURE TO BEAM
< 500 mW Ar-Kr-HeNe-HeCd 442-633 nm
CLASS IIIb LASER PRODUCT

Prospetto sistemi

Microscopio verticale

1: stativo microscopio verticale, 2: obiettivi, 3: tavolo campioni microscopio, 4: condensatore, 5: rivelatore a luce trasmessa (non descansita), 6: modulatore UV (solo per sistemi UV), 7: otturatore sicurezza laser, 9: fibre ottiche in costruzione chiusa (tutte le fibre ottiche che portano alla testina di scansione), 10: raggruppamento del fascio, modulatore VIS, 11: testina di scansione, 12: unità di alimentazione (Supply Unit), 13: oculari

Microscopio inverso

1: stativo microscopio inverso, 2: obiettivi, 3: tavolino portacampione microscopio, 4: condensatore, 5: lastra in alluminio con funzione di captatore raggio; astuccio di protezione fra condensatore e rivelatore luce trasmessa, 6: collegamento per testina di scansione (la testina di scansione è la stessa dello stativo microscopio verticale)

Avvio del sistema operativo

Il sistema operativo viene avviato automaticamente, non appena il PC viene acceso. Inizialmente verrà visualizzata una schermata di partenza.
Farsi riconoscere dal computer. Come si può dedurre dalle istruzioni nel campo di dialogo mostrato, è possibile farsi riconoscere dal sistema premendo contemporaneamente i tasti **Ctrl**, **Alt** e **Canc**.
Non appena premuti i tasti Ctrl, Alt e Canc, si apre il campo di dialogo Informazioni **Login**.
Inserire la propria parola di riconoscimento, con cui ci si identifica quale utente valido di questo computer.
Il nome utente standard per il sistema Leica TCS SP2 è "TCS_User".
Non è impostata alcuna parola di riconoscimento standard. Si raccomanda di prevedere per ogni utente un ID Utente specifico (System administrator). Vengono quindi formati registri personali che possono essere letti soltanto dai rispettivi utenti. Dato che il software LCS si basa sull'amministrazione utenti del sistema operativo, vengono creati alcuni file anche per l'amministrazione di profili utente specifici del software LCS. Per la creazione di utenti si rimanda al capitolo "Creazione di utenti" di questo manuale.
Non appena ci si è fatti riconoscere con il proprio ID Utente, è possibile modificare la propria parola di riconoscimento. Per fare questo, premere contemporaneamente i tasti **Ctrl**, **Alt** e **Canc**.
Fare quindi clic su **Change password** (Cambia password). Si apre il campo di dialogo **Change password**.
Inserire nel campo **Old Password** (Vecchia password) la propria attuale parola di riconoscimento valida (il campo d'inserimento della parola di riconoscimento è sensibile alla differenza fra maiuscole e minuscole: prestare quindi attenzione se si stiano utilizzando lettere maiuscole o minuscole).
Premere quindi il tasto di tabulazione. Premendo il tasto di tabulazione, il cursore passa al campo successivo.
Inserire ora la propria nuova parola di riconoscimento, e premere quindi ancora una volta il tasto di tabulazione. Inserire ora per conferma la nuova parola di riconoscimento una seconda volta. In questo modo vengono esclusi errori di battitura. Ciò è di grande importanza, soprattutto perché i caratteri che vengono battuti appaiono sullo schermo solo come asterischi.

Nel caso sia stata inserita una parola di riconoscimento non corretta in fase di conferma, viene mostrato un avviso. Provare un'altra volta.

Fare quindi clic su OK. La prossima volta in cui ci si farà riconoscere, sarà attiva la nuova parola di riconoscimento.

Prestare attenzione al fatto che, una volta inserita una parola di riconoscimento, non si può in alcun caso dimenticarla. Senza la parola di riconoscimento corretta, non si ha più la possibilità di accedere al computer.

Viene ora mostrato il campo di dialogo Welcome (Benvenuti). Attendere un attimo di tempo per leggere il consiglio "Did you know..." (Lo sapevate che...), quindi fare clic sul pulsante **Close** (Chiudi) per iniziare il lavoro con il sistema operativo.
Lavorare con il mouse
Per poter utilizzare il sistema operativo in maniera davvero efficiente, è necessario un mouse.
Occorre conoscere le seguenti azioni da effettuare con il mouse:
Andare su significa che occorre posizionare il cursore (che muovendo il mouse prende la forma di una freccia) sull'oggetto indicato, muovendo il mouse. La punta della freccia deve toccare l'oggetto.
Fare clic su significa che occorre posizionare il cursore su un dato oggetto come descritto sopra,

quindi premere brevemente per una volta il tasto del mouse e rilasciarlo. Se non indicato diversamente, utilizzare sempre per questa azione il tasto sinistro del mouse (altrimenti verrà ad esempio indicato di fare clic sul tasto destro del mouse). Nel fare clic su un oggetto, normalmente esso viene selezionato.
Fare doppio clic su significa che occorre posizionare il cursore su un dato oggetto come descritto sopra, quindi premere brevemente per due volte il tasto del mouse e rilasciarlo. Nel fare doppio clic su un oggetto, normalmente esso viene attivato.
Trascinare significa che occorre posizionare il cursore su un oggetto, premere il tasto del mouse e muovere il mouse in un altro punto, tenendo premuto il tasto del mouse. Se non indicato diversamente, utilizzare sempre per questa azione il tasto sinistro del mouse (altrimenti verrà ad esempio indicato di trascinare col tasto destro del mouse).

L'interfaccia operatore del sistema operativo

L'interfaccia operatore di base del sistema operativo viene denominata "**Desktop**" (Scrivania). Il Desktop costituisce lo sfondo per gli oggetti in esso contenuti.
I collegamenti sul Desktop danno all'utente la possibilità di interagire con il sistema in maniera logica, e di indicare gli oggetti del sistema.

Lo sfondo su cui sono raffigurate tutte le immagini e i campi di dialogo viene denominato Desktop. Nella barra delle applicazioni strumenti vengono mostrati tutte le finestre e i programmi richiamati. È possibile cambiare tra le varie finestre e i vari programmi facendo clic sui nomi corrispondenti sulla barra delle applicazioni.
Il pulsante Start (Avvio) apre un menu tramite il quale è possibile avviare i programmi desiderati. Fare clic sul pulsante Start. Il menu che si apre contiene varie opzioni menu con alcuni sottomenu. Fare clic sull'opzione desiderata.
Sul Desktop sono inoltre disponibili alcuni simboli. È possibile attivare uno di questi simboli con un doppio clic al di sopra di esso.
Qui di seguito vengono brevemente illustrati i singoli oggetti visibili sul Desktop.
Tra gli oggetti standard sul Desktop vi è il simbolo **My Computer** (Risorse del computer). Con un **doppio clic** su questo simbolo, si apre la finestra My Computer.
Tramite la finestra "My Computer" è possibile avere facile accesso ai componenti principali del sistema di computer o della postazione di lavoro, p. es. al disco fisso o ai dischi fissi, oppure ai drive dei floppy. Quando, per esempio, si fa doppio clic sul simbolo **Hard disk [C:]** (Disco fisso [C:]), viene mostrato il contenuto del disco fisso del PC. In questa maniera l'utente ha la possibilità di indicare risorse locali come oggetti. Dalla finestra "My Computer" è inoltre possibile accedere anche al pannello di controllo (Simbolo Control Panel) ed alla stampante del calcolatore di comando, nel caso sia stata installata una stampante. Nel caso sia stata installata una delle applicazioni ausiliarie locali, come "Dial-Up Networking" (Rete a linea commutata), essa appare anche nella finestra "My Computer" (Risorse del computer).
Tramite il simbolo **Control Panel** nella finestra My Computer, è inoltre possibile indicare e modificare qualsiasi componente del sistema si desideri. La finestra Control Panel contiene poi anche numerosi simboli che consentono di comandare il sistema. È possibile che sul PC siano visibili altri simboli qui non illustrati. Il motivo di questo può essere p. es. che sia stato installato un altro hardware, oppure può essere che esista un collegamento a un modem o ad una rete. un ulteriore motivo può poi essere l'installazione di altre opzioni del sistema operativo.
Facendo doppio clic sul simbolo **Network Neighborhood** (Risorse di rete), si apre il campo di dialogo Network Neighborhood, che mostra chi e quali apparecchi sono connessi con la propria postazione di lavoro. Questo campo di dialogo presenta un meccanismo molto semplice per effettuare ricerche tra i sistemi di rete e le risorse coi quali è possibile creare una connessione indipendentemente dal rispettivo produttore della rete. In precedenza, quando un sistema doveva essere connesso contemporaneamente con tipi di rete differenti, all'atto del collegamento del sistema e dell'indicazione della rete ci si doveva sempre attenere alle indicazioni dei rispettivi produttori. Al contrario, il sistema operativo è in grado di offrire una vista generale dell'intera rete, anche qualora la rete contenga risorse di Windows NT, Novell NetWare, Banyan Vines o altri.
Il simbolo **Inbox** viene utilizzato quando Microsoft Exchange è attivo nel sistema. Il sistema operativo dispone di un servizio integrato di posta elettronica basato su Microsoft Mail (MS Mail) e Microsoft Exchange. Nel caso in cui nella rete a cui il proprio sistema è collegato sia già presente un MS Mail Postoffice (Ufficio postale MS Mail), il client di posta elettronica del sistema operativo può creare direttamente una connessione ad esso. Tramite il simbolo Inbox è possibile accedere alle proprie informazioni.

Il simbolo **Recycle Bin** (Cestino) rappresenta il deposito degli oggetti cancellati. Fino a quando un file si trova in detto Cestino, esso può essere ripristinato rapidamente e semplicemente, nel caso fosse stato cancellato per errore. Il sistema operativo mantiene i file in questo deposito sino a quando il sistema non disponga più di spazio libero. In questo caso, il sistema operativo inizia a cancellare il contenuto del Cestino (Recycle Bin) in modo tale da cancellare dapprima i file più vecchi, secondo il principio FIFO (First-in First-out).

I file sovrascritti non vengono salvati nel Cestino, poiché due applicazioni diverse hanno utilizzato un file con lo stesso nome.

Con un doppio clic sul simbolo Recycle Bin è possibile visualizzare il contenuto del Cestino. Nel caso venga mostrata una finestra vuota, ciò è la conferma che nel Cestino non si trova alcun oggetto.
Il menu di avvio
Con un singolo clic sul tasto sinistro del mouse sul pulsante Start viene aperto il menu di avvio. Al suo interno vengono mostrate sette categorie principali di opzioni, con le quali è possibile iniziare a lavorare con il sistema.
Con un singolo clic sul tasto destro del mouse si apre un piccolo menu di comando, in cui sono contenute le opzioni Open (Apri), Explore (Esplora) e Find (Trova).
La modalità funzionale viene descritta qui di seguito.
Avvio di programmi
Il menu di avvio contiene diverse categorie, in cui sono salvati le applicazioni ed i lavori. È possibile visualizzare i singoli sottomenu puntando con il mouse sull'opzione desiderata. Con questa azione viene automaticamente indicato il relativo sottomenu successivo. In questo caso non vi è necessità di fare clic con il mouse.
L'opzione **Programs** (Programmi) apre il sottomenu dei programmi. In questo menu sono elencate tutte le applicazioni installate e disponibili. Alcune opzioni sono contrassegnate con una freccia. Detta freccia indica che segue un ulteriore sottomenu. Puntare con il mouse p. es. sull'opzione **Accessories** (Accessori), per visualizzare il relativo sottomenu. Nel sottomenu di Accessories viene mostrata una lista dei programmi integrati nel sistema operativo.
SUGGERIMENTO: Quando con il mouse si trascina (drag) un oggetto dal desktop o da Windows Explorer e lo si rilascia (drop) sul pulsante Start, viene automaticamente creato un collegamento. Tale oggetto appare da subito nel menu di avvio, e può ora essere richiamato tramite questo menu.
Vi sono varie possibilità per avviare un programma. Il metodo descritto qui di seguito è il più semplice:
1. Fare clic sul pulsante Start.
2. Fare clic su Programs.
3. Fare clic sul gruppo contenente il programma che si desidera avviare (p. es. LCS).
4. Fare clic sul programma che si desidera avviare (p. es. Leica LCS).

È inoltre possibile avviare un programma aprendo un documento creato col programma in questione. Il programma viene avviato automaticamente all'apertura del documento. Fare doppio clic su una cartella nella finestra My Computer (Risorse del computer), o in Windows Explorer, per aprirla. Al posto di questa procedura, è anche possibile fare clic sul pulsante Start e selezionare nel menu Documents (Documenti) un documento utilizzato di recente.
Vi è inoltre la possibilità di avviare un programma facendo doppio clic sul simbolo del programma (cosidd. Shortcut, scorciatoia) sul desktop. Gli Shortcuts sono collegamenti ad altri file. Quando si fa clic su uno Shortcut, Windows segue il collegamento sino al file originario.
Nel caso si utilizzi molto frequentemente un documento o un programma, può essere che si desideri creare un opportuno Shortcut che sia disponibile sul desktop. Per fare questo, occorre puntare con il mouse sull'oggetto desiderato, premere e mantenere premuto il tasto destro del mouse e trascinare l'oggetto al di fuori della finestra Windows Explorer o My Computer. Quando si rilascia ora il tasto del mouse, appare un menu. Selezionare in questo menu l'opzione Create Shortcut(s) Here (Crea scorciatoia(-e) qui). Alcuni programmi creano automaticamente uno Shortcut durante la procedura d'installazione.

Il sistema operativo non rintraccia attivamente il collegamento fra uno Shortcut e l'originale. Questo significa che, nel caso in cui ad esempio si crei uno Shortcut per un programma, e poi si sposti (e non si copi) l'originale in un'altra cartella, può accadere che lo Shortcut non funzioni più.

La cartella Startup (Esecuzione automatica) possiede una funzione speciale: tutti i programmi che si trovano in questa cartella vengono avviati automaticamente non appena viene avviato il sistema operativo.
Nel menu Documents (Documenti) sono elencati i nomi degli ultimi 15 file che sono stati creati. È possibile aprire ciascuno di questi file, e contemporaneamente l'applicazione ad essi correlata, con un semplice clic sul nome del file in questo menu.

Tutti i file documento che sono stati aperti da un'applicazione non sono qui elencati (per fare questo, nella relativa applicazione vengono di regola selezionati i comandi menu File/Open (File/Apri)). In questa lista sono contenuti solamente tutti i documenti che sono stati aperti direttamente dal desktop.

Il menu Settings (Impostazioni) contiene tre comandi con i quali è possibile apportare modifiche alle impostazioni del sistema. Tramite questo menu è possibile accedere direttamente al pannello di controllo e alla stampante. Da qui è inoltre possibile aprire la finestra Task Properties (Proprietà applicazioni).
La possibilità di richiamare in questo modo i più importanti programmi di servizio della configurazione di sistema è quindi molto utile, soprattutto nel caso in cui un'applicazione sia già aperta e attiva in alta priorità, e si desideri apportare rapidamente una modifica.
L'opzione Find (Trova) offre una possibilità molto semplice di ricerca delle risorse di sistema. Nel sottomenu di questa opzione è possibile eseguire tre tipi di ricerche.

La barra delle applicazioni

La barra delle applicazioni, che si trova sul bordo inferiore dello schermo, mostra costantemente quali applicazioni siano eseguite al momento sul sistema. Inoltre, essa rappresenta una semplice possibilità di cambiare tra le singole applicazioni. Non appena viene aperta un'ulteriore applicazione, le icone ridotte dei programmi già aperti nella barra degli strumenti vengono adattate in modo tale che anche l'icona ridotta della nuova applicazione abbia spazio nella barra della applicazioni. In questa maniera si assicura che tutte le applicazioni aperte siano sempre visibili nella barra delle applicazioni. Per passare da un programma in funzione a un altro, occorre soltanto fare clic sull'icona ridotta del programma desiderato nella barra delle applicazioni.
La barra delle applicazioni fornisce inoltre costantemente informazioni e funzioni ausiliarie. Ad esempio, l'ora del sistema e la regolazione del volume, nel caso in cui sia stata installata una scheda audio. Tutte queste funzioni possono essere modificate e adattate a piacere dall'utente.

Impostazione di data e ora

Vi è la possibilità di impostare la data attuale, l'ora e il fuso orario con il simbolo Date/Time (Data/ora) nella finestra Control Panel (Pannello di controllo). Questa impostazione è di grande importanza, dato che il sistema operativo provvede tutti i file con una data ed un'ora, non appena essi vengono creati o modificati. È possibile selezionare entrambe le opzioni facendo clic sulla relativa scheda di registro.

Come modificare data e ora

Fare clic sulla data desiderata, o utilizzare i pulsanti di comando, per modificare il mese e l'anno indicati. L'ora può inoltre essere modificata selezionando dapprima l'indicatore digitale, quindi impostando l'ora con l'ausilio della freccia puntata verso l'alto e verso il basso.

Come modificare il fuso orario

Selezionare dall'elenco a discesa sul margine superiore del campo di dialogo il fuso orario opportuno. Prestare attenzione che sia selezionata l'opzione di commutazione automatica fra ora legale e ora solare. In alcuni sistemi è inoltre possibile trascinare sulla carta mondiale la zona contrassegnata e rilasciarla nel punto corretto.
Quando nel sistema operativo vengono effettuate modifiche alle impostazioni di data ed ora, l'orologio CMOS a batteria del sistema viene aggiornato.

A seconda della configurazione, può accadere che sistemi che siano collegati a una rete ricevano dal server di rete un aggiornamento di data e ora ad ogni richiesta di riconoscimento. Nel caso l'ora del server sia errata, anche l'ora delle postazioni di lavoro sarà scorretta. In questo caso, si prega di informare il proprio amministratore di rete.

Come richiamare la Guida
Il sistema operativo contiene un esauriente e potente sistema di guida. Oltre ai menu di guida disponibili in ogni finestra, per il menu di avvio vi sono anche alcuni aiuti autonomi e separati dal resto. Per richiamarli, occorre fare clic con il mouse sul pulsante Start (Avvio), e quindi su Help (Guida).
In questo campo di dialogo sono disponibili tre schede di registro: Contents, Index e Find (Contenuto, Indice e Trova). La scheda di registro Contents (Contenuto) è quella in alto. È possibile richiamare le altre schede di registro con un semplice clic al di sopra di esse.
Contents
La scheda di registro Contents (Contenuto) indica i singoli argomenti della guida. Gli argomenti della guida sono suddivisi in categorie, e vengono rappresentati con piccoli simboli a forma di libro. Fare doppio clic su uno dei libri per aprirlo. Vengono ora mostrati i libri e i documenti contenuti all'interno. Fare doppio clic su uno dei libri o dei documenti per aprirlo.
Index
La scheda di registro Index (Indice) contiene un indice con tutti gli argomenti disponibili. Inserire l'argomento che si desidera consultare. Mentre vengono inserite le prime lettere, la lista viene sfogliata, e viene indicata la parte corrispondente nella lista alfabetica dell'indice. Una volta trovato nella lista l'argomento di guida desiderato, fare doppio clic sull'argomento per indicarlo.
Find
La scheda di registro Find (Trova) offre, al posto della ricerca per categorie, la possibilità della ricerca a tutto testo. Inserire nel campo testuale il termine o l'espressione riguardo al quale si desidera cercare una voce nella guida. Il campo testuale è collegato con una lista di vocaboli nei file di guida. Tutti i termini o le espressioni corrispondenti ai termini od espressioni inseriti vengono mostrati. È possibile inserire più di un termine separando fra loro i singoli termini con uno spazio vuoto. Nel caso si desideri modificare l'opzione di ricerca, richiamare l'opzione menu Options (Opzioni). Quando si fa clic su questa scheda di registro per la prima volta, Windows comunica che occorre dapprima creare una lista. Fare clic su Next (Successivo), quindi su Finish (Termina), per creare la lista. È ora visibile la scheda di registro principale Find. Inserire il termine desiderato nel campo testuale in alto. Fare quindi clic nel campo centrale su un termine per limitare la ricerca. Scorrere da ultimo la lista di argomenti della guida visualizzata sul margine inferiore e fare doppio clic sull'argomento che si desidera leggere.
Una volta letto per intero l'argomento, è possibile fare clic su Help Topics (Argomenti della Guida), per tornare alla schermata principale della guida, oppure su Back (Indietro), per tornare all'argomento della guida precedente. Fare clic sul pulsante Close (Chiudi) per uscire dalla guida.
Chiusura del sistema operativo (Shutdown)
Di massima, fare dapprima sempre clic sul comando **Shut Down** (Spegni), prima di spegnere il PC. Con il comando Shut Down, il sistema operativo viene chiuso correttamente (spegnimento graduale). Accertarsi contemporaneamente che anche tutti gli altri processi ancora in corso vengano arrestati regolarmente, e che i dati che si trovino eventualmente nella cache vengano trasferiti dalla cache al disco fisso. Per lo spegnimento graduale del sistema, è possibile disporre di diverse opzioni.

Quando si spegne il computer senza un precedente, regolare spegnimento graduale, si possono verificare considerevoli perdite di dati.

Creazione di utenti

1. Effettuazione del login come Administrator
Farsi riconoscere come amministratore. Per fare questo, utilizzare l'ID "Administrator" (Amministratore) e la password "Admin".
2. Aprire lo User-Manager
Selezionare ***Start (Avvio)→Programs (Programmi)→Administrative Tools (Strumenti di amministrazione)→User Manager (Gestione utenti)***
3. Definire un nuovo utente
Per fare questo, inserire nella finestra di dialogo aperta almeno i seguenti dati:
1. Username
2. Password (va inserita un'altra volta nella riga successiva a titolo di conferma)
Selezionare dalle caselle di spunta le due voci seguenti:
a.) "User must change password at next logon" ("L'utente deve cambiare password al prossimo ingresso" - In questo modo, l'utente appena creato può definire la sua propria password in fase di login)
b.) "Password never expires" ("La password non scade mai" - In questo modo, una password che sia stata definita una volta è valida sino a quando essa venga modificata nello User Manager, oppure sino a quando l'utente non venga cancellato)
Selezionare, nella riga in fondo della finestra di dialogo, l'opzione "Profiles" (Profili). Qui verrà ora indicato, nel campo "Local path" (Percorso locale), il seguente percorso di archiviazione dei file specifici dell'utente:
d:\users\username ("username" è un riempitivo. Al suo posto va indicato il nome utente effettivamente definito.)

I dischi fissi installati dal produttore vengono forniti con 2 partizioni (C:\ e D:\). L'indice utenti va creato nella partizione D:\.

Messa in funzione del sistema confocale

1. Verificare se il connettore per protezione software sia presente sulla porta parallela della stampante del calcolatore.
Senza il connettore per protezione NON è possibile avviare il software LCS.

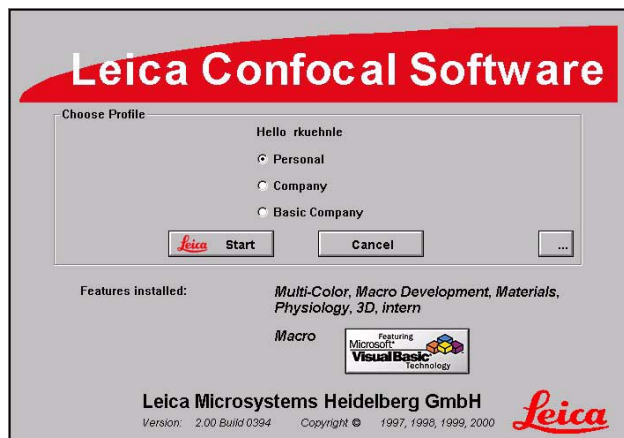
2. Accendere il microscopio, o i microscopi, e le sorgenti luminose.
Tutti gli stativi manuali Leica per microscopi (DM-LM, DM-IRB, DM-R, DM-LFSE) possono essere accesi e spenti con gli interruttori montati lateralmente sullo stativo.
Tutti gli stativi per microscopio automatici Leica (DM- LFSA, DM-RXA, DM-RXA2, DM-RE, DM-IRBE) possono essere inseriti e disinseriti con gli interruttori collocati lateralmente sullo stativo.
Gli stativi per microscopio Leica DM-LFSA, DM-IRE2 e DM-RXA2 possono essere inseriti e disinseriti con l'unità elettronica separata (LEICA CTR MIC Electronics box).

Tutte le lampade a fluorescenza sono equipaggiate di un componente di rete. Esse si possono quindi accendere e spegnere con detto componente di rete.

3. Inserire ora sul pannello di comando gli interruttori del calcolatore di comando (PC), dello scanner confocale (Scanner) e dei laser (Lasers)

4. Farsi riconoscere dal calcolatore
Nel caso in cui sia già stato creato un proprio ID, si prega di utilizzarlo. In questo modo ci si assicura che anche nella pratica le impostazioni specifiche dell'utente vengano salvate e tenute a disposizione solamente per l'utente. Nel caso l'amministratore di sistema non abbia ancora creato un proprio ID personale, farsi riconoscere come "TCS_User". Qui non va inserita alcuna password.

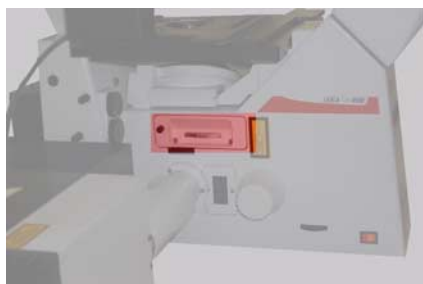
5. Avviare il programma LCS
Per fare questo, fare clic sul simbolo del programma sul desktop del calcolatore.

6. Selezionare ora un profilo software
Per ogni utente occorre creare un profilo personale che contenga sia la struttura dell'interfaccia grafica utente, sia la definizione delle impostazioni specifiche per l'utente del sistema confocale.

Al prossimo passo, attendere che l'inizializzazione dei componenti hardware venga conclusa completamente.

7. Sistemare un campione e centrarlo nella modalità convenzionale per microscopio.
Focalizzare quindi un punto del campione che si desidera osservare. Impostare quindi l'illuminazione Köhler (vedi capitolo "Illuminazione Köhler" pagina 43).

a.) Impostare l'osservazione convenzionale sul microscopio verticale della serie DM-Rxxx, DM-LFxx

Microscopi serie DM_Rxx: *Microscopi serie DM-LFSx:*
Posizionare la leva di comando su "VIS", e ruotare la rotella filtro a fluorescenza sul dado filtri corrispondente
Pos. 1: DAPI (opzionale); Pos. 2: TRITC; Pos. 3: FITC; Pos. 4: posizione vuota (scansione)

b.) Impostare l'osservazione convenzionale sui microscopi inversi della serie DM-IRxx.

Microscopi serie DM_IRxx:
Estrarre completamente la leva di comando sinistra, e ruotare la rotella filtri a fluorescenza sul dado filtri corrispondente
Pos. 1: DAPI (opzionale), Pos. 1: TRITC, Pos. 3: FITC, Pos. 4: posizione vuota (scansione), spingere completamente all'interno la levetta di commutazione destra
In caso di sistema UV: ruotare la lente del tubo nella posizione "Scan"

Microscopi serie DM_IRxx:
Posizionare la rotella lenti tubo destra su "Scan".

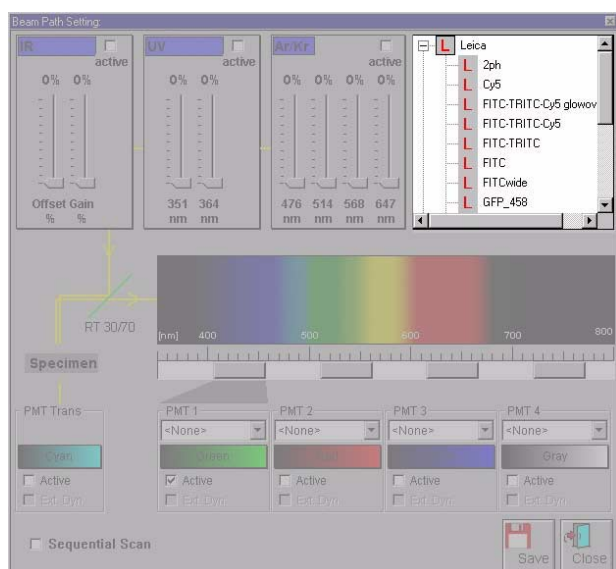
8. Passare ora al funzionamento confocale

a.) Commutazione su osservazione confocale per i microscopi verticali serie DM-Rxxx, DM-LFxx

Microscopi serie DM_Rxx: *Microscopi serie DM-LFSx:*
posizionare la leva di comando e la rotella filtri a fluorescenza su "Scan" (Scansione)

9. Selezione di un set specifico di parametri di ripresa (applicazione)

Premere il tasto "Beam" (Raggio) nella fase operativa "Acquisition" (Acquisizione).

Selezionare un metodo nella finestra di dialogo aperta (finestra in alto a destra) "Beam Path Setting" (Impostazione percorso raggio).

Per "metodo" si intende un set di impostazioni hardware (IPS: Instrument Parameter Setting - Impostazione Parametri Strumento) specifico per una determinata tecnica d'immagine e per un determinato tipo di preparazione del campione. La denominazione FITC/TRITC contraddistingue, ad esempio, le impostazioni per una ripresa a doppio canale (simultanea) per i due coloranti fluorescenti FITC e TRITC. Oltre ai metodi predefiniti dall'azienda, si possono ovviamente definire e salvare anche metodi propri. Vedi a questo proposito il capitolo "Adattamenti software da parte dell'utente".

10. Selezione dell'obiettivo del microscopio

Premere il tasto "Obj." (Obiettivo) nella fase operativa "Acquisition" (Acquisizione).

Selezionare dalla finestra di dialogo aperta l'obiettivo che si desidera utilizzare.

In caso di stativi per microscopio automatici, l'obiettivo del microscopio selezionato viene portato automaticamente nel percorso del raggio.

Per gli altri stativi, ciò va eseguito manualmente.

11. Selezione del procedimento di scansione

Premere il tasto "Mode" (Modalità) per selezionare il procedimento di scansione.

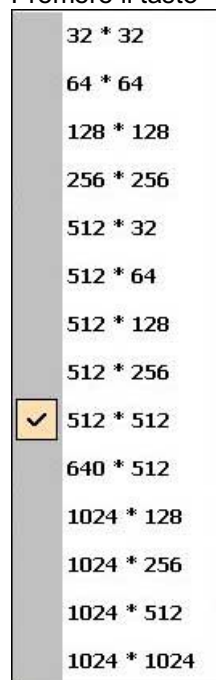
Con il procedimento di scansione impostare quale tipo di serie di dati dev'essere acquisito. È possibile scegliere fra:

a.) Procedimento di scansione spaziale (xyz, xzy)

b.) Procedimento di scansione temporale (xt, xyt, xzt, xyzt)

c.) Procedimento di scansione spettrale (λxy, xzλ)

12. Selezione del formato di scansione

Premere il tasto "Format" (Formato) per selezionare il formato di scansione.

Con questo formato di scansione stabilire il numero di punti raster con cui lo scanner deve scandire il campo di scansione.

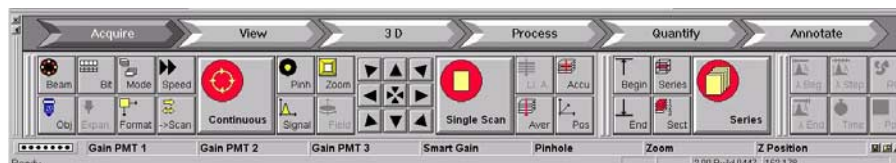
13. Ottimizzazione dei parametri di ripresa nella scansione continua

Premere il tasto "Continuous" (Continua) per l'avvio della scansione continua.

Non appena la scansione continua è iniziata, è possibile ottimizzare la qualità dell'immagine con la console di comando e con i parametri di ripresa su di essa definiti.
Appartengono ai parametri di ottimizzazione:
a.) l'esatta posizione z all'interno del campione
b.) il fattore di rinforzo del rivelatore selezionato
c.) il diametro del diaframma di rilevamento a foro
d.) il fattore di zoomata

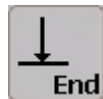
14. Acquisizione di un set di dati spaziale tridimensionale (serie 3D)

14.1. Cercare il limite superiore del set di dati che si desidera acquisire.
Per fare questo, utilizzare il bottone corrispondente per il posizionamento Z della console di comando.

L'impostazione standard della posizione z si trova sulla posizione 7 della console di comando.

Disposizione standard della console di comando (margine inferiore dello schermo)

14.2. Premere il tasto "Begin" (Inizio) per definire il punto iniziale della serie 3D.

14.3. Cercare il limite inferiore del set di dati che si desidera acquisire.
Per fare questo, utilizzare il bottone corrispondente per il posizionamento Z della console di comando.

14.4. Premere il tasto "End" (Fine) per definire il punto finale della serie 3D.

14.5. Arrestare ora la scansione continua premendo un'altra volta il tasto "Cont." (Continua).

14.6. Premere il tasto "Sect." (Sezioni) per definire il numero delle sezioni ottiche.

È possibile ottenere ulteriori dettagli su questa funzione dalla Guida in linea.

14.7. Premere il tasto "Aver." (Media) per definire il numero di processi di mediatura (Frame-Average / Mediatura fotogrammi).

Con questo procedimento vengono mediate sempre riprese di una sola sezione ottica.

14.8. Premere ora il tasto "Series" (Serie) per l'acquisizione della serie 3D.

15. Salvataggio dei dati immagine

Selezionare dalla riga menu ***File->Save as*** (File - Salva con nome) per salvare il set di dati.

Per ulteriori dettagli sul salvataggio di set di dati e sulle informazioni relative alla memorizzazione vedi capitolo „Apertura e salvataggio di set di dati“, pagina 49.

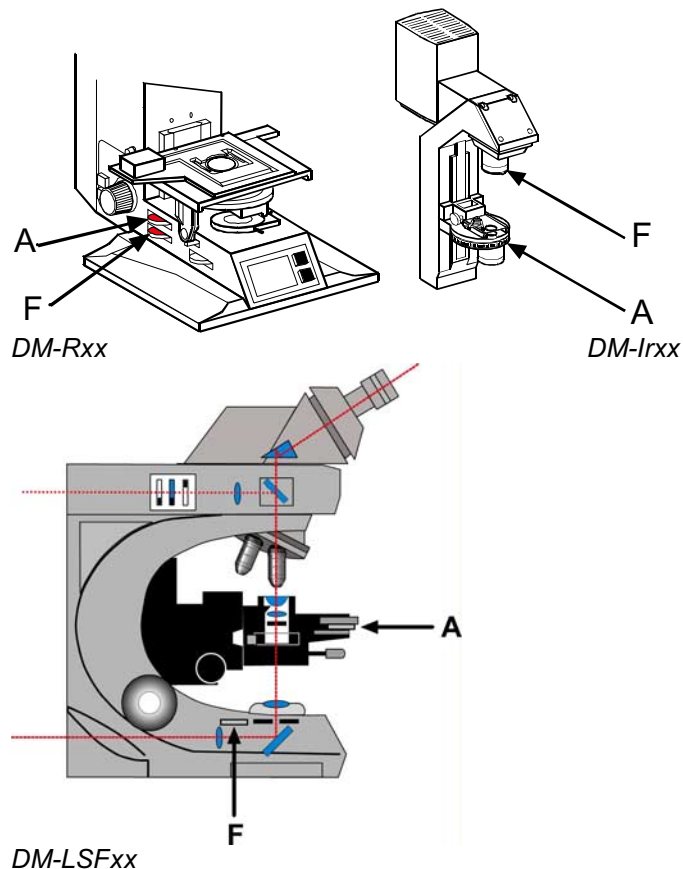
Regolazione dell'illuminazione Köhler

Che cos'è l'illuminazione Köhler?

In un'immagine microscopica si può fotografare sempre e soltanto una determinata zona di un campione (campo dell'immagine). L'illuminazione Köhler rende possibile illuminare con precisione questa zona. Questa precisa illuminazione del campo dell'immagine funziona nel modo seguente:
Quando la zona illuminata è più piccola del campo dell'immagine, il cono luminoso intercettato dall'obiettivo, e quindi l'apertura numerica, si rimpicciolisce. Dato che il potere risolvente ottico dipende direttamente dall'apertura numerica, in caso d'illuminazione ridotta viene diminuito anche il potere risolvente ottico, cosa non desiderata nella maggior parte dei casi.
Quando la zona illuminata è più grande del campo dell'immagine, si ha un incremento di luce diffusa. Ciò comporta, d'altra parte, una diminuzione del contrasto dell'immagine. Come conseguenza le strutture otticamente separate dell'immagine microscopica non possono più essere osservate.
L'illuminazione Köhler rappresenta un compromesso tra massimo contrasto e massimo potere risolvente. Spesso gli obiettivi microscopici più potenti raggiungono il migliore comportamento ottico solo con un'illuminazione Köhler regolata con precisione.

Regolazione dell'illuminazione Köhler

1. Messa a fuoco
Impostare con precisione una zona d'interesse del campione. In questa fase, non prestare ancora attenzione alla qualità dell'immagine.

2. Apertura del diaframma ad apertura
Aprire completamente il diaframma ad apertura. Esso verrà in seguito nuovamente chiuso sino a quando verrà raggiunto il contrasto desiderato.

A: diaframma ad apertura; F: diaframma di campo

3. Chiusura del diaframma di campo
Il campo dell'immagine diventerà scuro nella maggior parte delle zone. Si vedrà un punto luminoso indefinito e sfocato. Nel caso detto punto luminoso scompaia dal campo visivo alla chiusura del diaframma di campo, il diaframma di campo va centrato. In questo caso, occorre aprire il diaframma di campo sino a quando il punto luminoso sarà visibile al margine del campo visivo.

Nel caso non sia visibile alcun punto luminoso, il condensatore è probabilmente regolato ad altezza errata. Regolare quindi l'altezza del condensatore, sino a quando sarà possibile vedere il diaframma.

4. Messa a fuoco
Regolare ora con precisione il bordo del punto luminoso modificando l'altezza del condensatore.

5. Centratura
Ruotare le viti di centratura del condensatore sino a quando il punto luminoso sia centrato a metà del campo visivo. La centratura è un po' più semplice se si apre leggermente il diaframma di campo per ingrandire il punto luminoso.

6. Apertura del diaframma di campo
Aprire ora il diaframma di campo sino a quando il punto luminoso scompaia esattamente al margine del campo dell'immagine.

7. Chiusura del diaframma ad apertura
Chiudere il diaframma ad apertura sino a quando si raggiunge il contrasto d'immagine desiderato (apertura a circa il 70% del diametro massimo).

8. Quando si sostituisce l'obiettivo
Può accadere che dopo la sostituzione dell'obiettivo occorra modificare la registrazione dell'illuminazione Köhler.

Manutenzione e pulizia

È possibile trovare informazioni sulla manutenzione del microscopio da ricerca convenzionale Leica negli appositi manuali.
Istruzioni e informazioni supplementari riguardanti i componenti del sistema confocale TCS SP2 sono riassunte qui di seguito.
Scelta della posizione
Non esporre mai il sistema a correnti d'aria. Occorre fare attenzione che il TCS SP2 non venga mai installato nelle vicinanze di montacarichi, condizionatori o altre aspirazioni o scarichi. Pianificare perciò con precisione il punto d'installazione.
Protezione del microscopio da grasso e polvere
Quando non il sistema non viene utilizzato, occorre sempre coprirlo con un foglio in plastica (incluso nella fornitura) o con un panno di cotone pulito. Il sistema va utilizzato in un ambiente più libero possibile da polvere e grasso. Quando nella torretta portaobiettivi non vi siano obiettivi, le posizioni libere vanno sempre provviste di coperture antipolvere.
Utilizzare agenti chimici aggressivi con molta attenzione
Procedere con la massima attenzione quando nel lavoro si abbia a che fare con acidi, soluzioni alcaline od altri prodotti chimici aggressivi. Prestare attenzione a tenere a distanza dette sostanze dai componenti ottici e meccanici del sistema.
Pulizia del sistema ottico
Il sistema ottico del microscopio deve essere sempre pulito. Non toccare in alcun caso i componenti ottici con le dita, o con qualcosa di polveroso o grasso.
Rimuovere la polvere con un pennellino fine e asciutto. Nel caso questo non sia sufficiente, si può utilizzare un panno pulito e inumidito con acqua distillata. Lo sporco ostinato si può rimuovere dalle superfici vetrate con alcol puro, cloroformio o nafta.
Nel caso una lente dell'obiettivo venga casualmente contaminata da olio d'immersione improprio o dal campione, si prega di rivolgersi al rappresentante Leica più vicino. In tale sede si provvederà volentieri a consigliare riguardo all'utilizzo di determinati solventi per la pulizia. È assolutamente necessario chiedere consiglio nella scelta dei solventi opportuni, in quanto alcuni solventi possono sciogliere il collante con cui la lente è stata montata.

Non aprire mai gli obiettivi per effettuarne la pulizia.

Le lenti a immersione vanno ripulite dall'olio da immersione direttamente dopo l'utilizzo. Per prima cosa, rimuovere l'olio da immersione con un panno pulito. Dopo aver rimosso la maggior parte dell'olio da immersione, porre un panno sottile, adatto alle lenti, sul lato d'immersione della lente. Applicare ora una goccia del solvente raccomandato per tale operazione, e tergere delicatamente con il panno la superficie della lente. Ripetere questa procedura sino a quando la lente non sia completamente pulita. Per fare questo, utilizzare ogni volta un nuovo panno per lenti pulito.
Pulizia delle superfici del microscopio
Utilizzare un panno di cotone o di pelle (umidificato con nafta o alcol) per pulire le superfici dell'alloggiamento del microscopio o dello scanner (parti verniciate).

Non utilizzare mai acetone, xilolo o diluenti al nitro, in quanto aggrediscono la vernice!

Tutti i componenti e i sistemi LEICA sono stati creati con cura, utilizzando i più moderni metodi di produzione. Nel caso in cui, ciononostante, vi fossero problemi con l'apparecchio, non tentare di riparare gli apparecchi o gli accessori, ma rivolgersi al proprio rappresentante Leica.

Il sistema confocale va pulito accuratamente prima di ogni variazione di posto. Ciò riguarda in particolare sistemi che si trovino in laboratori di ricerca medico-biologica.

Ciò si rende necessario per eliminare una contaminazione eventualmente presente, ed evitare, in tal modo, di infettare e mettere in pericolo altre persone. Prestare attenzione in questa fase non soltanto alle superfici, ma in particolare anche ai ventilatori e alle apparecchiature di raffreddamento, dato che in questi punti si accumula frequentemente polvere.

Prospetto del Leica Confocal Software

Avvio del software
Condizioni preliminari per l'avvio del software
Il software LCS dispone di un sistema di protezione che garantisce che ogni licenza software acquistata non possa funzionare contemporaneamente su due computer. Con questo sistema vengono inoltre abilitati anche tutti i pacchetti applicativi acquistati separatamente. Il sistema di protezione consiste di una chiave hardware (cosidd. dongle) che va innestata sulla porta parallela del calcolatore di comando. La funzionalità della porta parallela (p. es. comando stampante o altro) non viene pregiudicata da tale operazione. Nel caso in cui occorresse far funzionare un calcolatore separato con una seconda installazione, la chiave hardware va innestata sulla porta parallela del secondo calcolatore.

Non appena sarà stata estratta la chiave hardware dal calcolatore di comando del sistema confocale, il software non potrà più essere avviato. Ciò significa che il sistema confocale non potrà più essere messo in funzione.

Il software LCS può essere avviato in due modalità: la modalità hardware e la modalità simulazione. Nella modalità hardware, tutti i componenti hardware del software vengono interrogati e inizializzati. Per questo motivo, in fase di avvio in modalità hardware, occorre dapprima avviare l'hardware, e dopo circa 20 secondi il software.
Nella modalità simulazione, il software funziona completamente senza hardware. Questa modalità di funzionamento è consigliabile in caso di seconde installazioni su un altro calcolatore, ed è adatta ad esempio a scopo didattico o per l'analisi offline di set di dati già acquisiti.
Modalità procedurali all'avvio del software
Selezionare **Start|Programs|Leica Confocal Software**. Si apre la schermata di avvio del Leica Confocal Software. In questa finestra è ora possibile scegliere fra tre profili.
Company (Azienda produttrice)
Con questa opzione, il Leica Confocal Software viene avviato con le impostazioni predefinite dal produttore. Ciò significa che la configurazione e la posizione della barra degli strumenti sono rigidamente predefinite. Tali impostazioni non possono essere modificate.
Personal (Personale)
Con questa impostazione viene utilizzato un profilo impostazioni specifico per l'utente. Il nome utente dipende nuovamente dall'account con cui una persona si fa riconoscere dal sistema operativo. Quando al primo avvio da parte di un utente non vi è ancora un profilo impostazioni personale, viene automaticamente utilizzata come profilo personale l'impostazione standard del produttore.
Last Exit (Ultima uscita)
Con questa opzione viene utilizzato l'ultimo profilo impostazioni usato.
Per gli utenti esperti:
Nel caso in cui si disponga di diversi profili impostazioni, è possibile caricarli all'avvio premendo con il puntatore del mouse sul pulsante con i tre piccoli puntini neri, che si trova sul margine inferiore destro delle opzioni profilo. Qui è anche possibile riportare il proprio profilo impostazioni attualmente impostato in sostituzione del profilo standard del produttore.
Dopo aver premuto sul pulsante Start (Avvio), il Leica Confocal Software viene avviato con il profilo impostazioni corrispondente.

Con l'utilizzo del profilo impostazioni selezionato, dopo un certo periodo di tempo il software si avvia anche autonomamente.

La concezione sperimentale del software
Il Leica Confocal Software permette di raggruppare dati immagine o risultati di fasi di elaborazione immagini. Ogni gruppo viene denominato "Experiment" (Esperimento), e salvato in uno speciale formato (*.lei). In questo modo, dati immagine originali sperimentali possono essere archiviati insieme con dati di presentazione immagini. È possibile ottenere ulteriori dettagli dal capitolo "Organizzazione dei dati tramite raggruppamento di esperimenti".

Struttura generale dell'interfaccia utente
L'aspetto dell'interfaccia grafica utente - che qui di seguito verrà abbreviata come GUI (**G**raphical **U**ser **I**nterface - Interfaccia Grafica Utente) - dipende molto fortemente dal profilo impostazioni utilizzato. Tuttavia, la GUI dispone di una serie di elementi standard.
La GUI dispone dei seguenti elementi standard:
La riga del menu
In essa si trovano le categorie File, View, Macro, Tools, Window e Help (File, Visualizza, Macro, Strumenti, Finestra e Guida). All'interno di queste categorie si possono trovare comandi e informazioni sulla rappresentazione generale, sull'impostazione e sull'adattamento all'utente. Essa non contiene funzioni per il comando diretto di funzioni di scansione. Queste ultime si trovano nel menu TCS (***View→Menu→TCS-Menu*** - Visualizza→Menu→Menu TCS*)*. La riga del menu non può essere configurata.
La finestra di visualizzazione (TCS_Viewer - Visualizzatore TCS)
In questa finestra vengono mostrati all'utente dati immagine, condizioni sperimentali e dati. La finestra delle immagini può essere configurata (vedi capitolo "Modifiche dell'interfaccia utente e definizione di impostazioni specifiche dell'utente"). La finestra delle immagini mostra non solo set di dati immagine confocali, ma anche dati sperimentali come le impostazioni di sistema. *Una finestra delle immagini per un nuovo esperimento può essere aperta con **File → New*** (File→Nuovo*).*
Menu TCS (TCS_Menu)
Il menu TCS contiene i pulsanti per le singole funzioni dell'apparecchio. Esso è suddiviso in singole fasi operative. A seconda dell'equipaggiamento software, il numero delle fasi operative può essere differente. Il set standard di fasi operative consiste nell'acquisizione dati (Acquire - Acquisizione), nella presentazione dell'immagine (View - Visualizza), nella ricostruzione delle superfici (3 D), nelle funzioni di misurazione (Quantify - Quantificazione), nelle funzioni di elaborazione e di analisi immagini (Process - Elabora) e nelle funzioni di documentazione (Annotate - Annota). Nel caso in cui nel profilo impostazioni attuale il menu TCS non venga mostrato, è possibile attivarlo e disattivarlo con ***View→Menu→TCS Menu*** (Visualizza→Menu→Menu TCS*).*
Campo pulsanti (Toolbar - Barra degli strumenti)
In questo campo possono essere inseriti alcuni tasti (pulsanti funzione), che possono essere disposti secondo le esigenze dell'utente. Il pregio del campo pulsanti risiede soprattutto nel fatto che esso può essere inserito e disinserito con tutto il contenuto di pulsanti. Per fare questo, procedere come segue: ***View→Menu→Container*** (Visualizza→Menu→Contenitore).
Finestra di visualizzazione per documenti (Experiment Overview - Panoramica esperimento)
In questa finestra vengono presentati in un albero di directory gli esperimenti acquisiti ed il loro contenuto. La finestra di visualizzazione può essere aperta con ***View→Experiment Overview*** (Visualizza→Panoramica→esperimento).
Barra di stato (Statusbar)
La barra di stato si trova al margine inferiore dell'interfaccia utente del Leica Confocal Software. In essa vengono mostrati:
- L'avanzamento del caricamento dei dati immagine (barra di avanzamento)
- Il numero di versione del software
- La denominazione della configurazione macchina (tipo di sistema)
È possibile ottenere dettagli sulle singole funzioni nel capitolo "Le funzioni del software LCS".

Apertura e salvataggio di set di dati

Formati file leggibili
I seguenti formati file possono essere aperti e presentati nel Leica Confocal Software
Esperimenti (*.lei):
Si tratta di un formato dati binario, specifico Leica. Detto formato è previsto per dati di esperimenti completi.
File TIFF (*.tif):
Si tratta di file immagine Leica, nei formati Single e Multi-TIFF. Possono essere letti sia file immagine in formati TCS utilizzati in precedenza, sia file esterni in formato RGB-TIFF.
Annotazioni (*.ano):
Anche in questo caso si tratta di un formato dati binario, specifico Leica. In esso vengono salvate le pagine di presentazione (Annotations - Annotazioni). Gli elementi inseriti nelle pagine di presentazione, come immagini, testi e grafiche, sono presenti ciascuno come singoli oggetti.
Alla lettura dei file, vengono caricati non solo i dati immagine, ma anche le impostazioni sperimentali.
Rilevazione automatica dei parametri di ripresa
Con il Leica Confocal Software possono essere rilevate per un nuovo esperimento le impostazioni hardware che sono state salvate per esperimenti o singole immagini. In questo modo si può eseguire l'acquisizione di esperimenti diversi con impostazioni invariate. Per la rilevazione, attivare la finestra di visualizzazione del set di dati di cui si desidera rilevare le impostazioni. Premere quindi il pulsante "Apply" (Applica), che si trova, nel profilo impostazioni del produttore, nel campo pulsanti [Toolbar] (barra degli strumenti).

*Nel caso non si trovi pronto il pulsante "Apply" (Applica) in una delle finestre indicate, è possibile caricare il tasto in una finestra a piacimento con **Tools→Customize** (Strumenti→Personalizza). Selezionare nella finestra di dialogo indicata il registro "Commands" (Comandi), categoria File. Fare clic con il tasto sinistro del mouse sul tasto "Apply" (Applica), mantenere premuto il tasto sinistro del mouse e trascinare il tasto nella finestra scelta. Rilasciare il tasto sinistro del mouse per inserire il tasto nella posizione attuale.*

Salvataggio di immagini
Fotogrammi ed esperimenti possono essere salvati negli stessi formati, dati già descritti nel capitolo "Formati file leggibili".
È possibile salvare le immagini e gli esperimenti con ***File→Save*** (File→Salva). Al primo salvataggio dell'esperimento viene automaticamente utilizzata la funzione "Save as" (Salva con nome), che richiederà l'inserimento di un nome file. Oltre alla definizione di un nome file appropriato, in questa fase è anche possibile scegliere il formato del file. Gli esperimenti possono essere salvati soltanto nel formato specifico Leica *.lei. All'atto del salvataggio degli esperimenti, è possibile salvare fotogrammi eventualmente presenti nei formati *.tif o *.raw.

Nel caso sia già stato salvato una volta l'esperimento o l'immagine, ogni ulteriore processo di salvataggio comporterà una sovrascrittura sui vecchi dati. Nel caso non si desideri che questo accada, e si desideri salvare i nuovi dati con un altro nome, occorre selezionare **File→Save as** *(File→Salva con nome).*

Organizzazione dei dati tramite raggruppamento di esperimenti
La concezione del Leica Confocal Software permette di riunire in un gruppo - un esperimento - fotogrammi, serie di immagini ed i risultati di fasi di elaborazione immagini. È possibile avere un prospetto degli esperimenti caricati nella finestra di visualizzazione esperimenti (Experiment Overview - panoramica esperimento). Nel caso la finestra di visualizzazione esperimenti sia chiusa, si può aprirla con ***View→Experiment Overview*** (Visualizza→Panoramica esperimento). Con ***File→New*** (File→Nuovo) e ***File→New (Template)*** (File→Nuovo/Modello) viene creato un nuovo esperimento. I file già salvati che vengono aperti vengono inoltre amministrati come esperimenti separati.
Raggruppamento di esperimenti
Una volta definito un nuovo esperimento con ***File→New***, oppure ***File→New (Template)***, è possibile inserirvi mano a mano i dati.

Le immagini acquisite con la funzione di scansione continua (Continuous scan), vengono automaticamente sovrascritte al successivo avvio di scansione. Nel caso si desideri conservare permanentemente un singolo fotogramma come parte di un esperimento, occorre selezionare la funzione di scansione passo-passo.

Parte di un esperimento è rappresentato dai dati acquisiti con le funzioni "Scansione passo-passo" o "Scansione in serie". Nel caso vengano eseguite su un set di dati funzioni di elaborazione immagini, è anche possibile salvare i risultati come parte dell'esperimento. Per fare questo, selezionare con un doppio clic il fotogramma desiderato, o la serie, dalla finestra di visualizzazione esperimenti. Eseguire ora le funzioni di elaborazione immagini (p. es. proiezione massima, immagine topologica o altro). Contrassegnare il campo all'interno della finestra di visualizzazione (Viewer - Visualizzatore) che si desidera conservare come parte dell'esperimento. Con il tasto destro del mouse (menu contestuale) selezionare ***Send to →Experiment*** (Invia a →Esperimento). L'opzione ***Selection (raw)*** (Selezione/grezzi) crea una copia dei dati grezzi dell'oggetto selezionato come una nuova parte separata dell'esperimento. L'opzione ***Selection (snapshot)*** (Selezione/istantanea) crea un'immagine RGB (Red-Green-Blue, Rosso-Verde-Blu) (senza dati tridimensionali, fotografia pura e semplice) dell'oggetto selezionato come nuova parte dell'esperimento.

Tasti di scelta rapida

Per l'accelerare le funzioni software ripetitive sono state definite speciali combinazioni di tasti:

Combinazione tasti	Funzione
F1	Apre la guida on line.
ALT + F8	Apre la finestra di dialogo Macros per avviare, modificare e cancellare macros.
ALT + F9	Apre la finestra di dialogo contenente macro già definite, che possono essere avviate da questa finestra di dialogo.
ALT + F10	Apre la Guida in linea per il linguaggio macro LCS.
ALT + F11 (opzionale)	Avvia l'ambiente di sviluppo VBA (opzionale).
CTRL + I	Con questa opzione si possono nuovamente installare licenze software.
CTRL + J	Apre la finestra di dialogo Objective (obiettivo) per la definizione e la selezione degli obiettivi del microscopio.
CTRL + L	Apre la finestra di dialogo Legend Info (informazioni legenda) per l'immissione di dati specifici dell'utente che possono essere salvati e visualizzati per la documentazione di riprese.
CTRL + M	Permette la scelta del microscopio Leica utilizzato.
CTRL + N	Apre un nuovo esperimento.
CTRL + O	Avvia la finestra di dialogo Open (apri) per aprire un file esistente.
CTRL + P	Apre la finestra di dialogo Printer Selection (selezione stampante).

CTRL + S	Salva l'esperimento attivo.
CTRL + T	

Funzioni menu

Le seguenti funzioni sono disponibili sulla riga del menu:

Menu File

New (Nuovo):
Questa opzione apre un nuovo esperimento in una nuova finestra di visualizzazione. Per la presentazione della finestra di visualizzazione viene utilizzata la preimpostazione attiva (vedi a questo riguardo il capitolo "Preimpostazioni e modelli").
New (Template) (Nuovo/Modello):
Questa opzione apre un nuovo esperimento in una nuova finestra di visualizzazione. Il tipo di presentazione della finestra di visualizzazione può essere scelto da un set di modelli.
Open (Apri):
Questa opzione apre un esperimento già salvato, oppure un singolo set di dati (dati immagine od annotazione). Per la presentazione della finestra di visualizzazione viene utilizzata la preimpostazione attiva (vedi a questo riguardo il capitolo "Preimpostazioni e modelli").
Open (Template) (Apri/Modello):
Questa opzione apre un esperimento già salvato, un singolo set di dati oppure file di documentazione o di presentazione. Il tipo di presentazione della finestra di visualizzazione può essere scelto da un set di modelli.
Close (Chiudi):
Questa opzione chiude l'esperimento attivo al momento. Qui l'esperimento non viene salvato automaticamente in precedenza.

Non viene fatta richiesta se prima della chiusura l'esperimento vada salvato.

Close all (Chiudi tutto):
Questa opzione chiude tutti gli esperimenti. Qui l'esperimento non viene salvato automaticamente in precedenza.

Non viene fatta richiesta se prima della chiusura l'esperimento vada salvato.

Save (Salva):
Salva l'esperimento attuale.
Save as (Salva con nome):
Salva l'esperimento attuale con un altro nome.
Save all:
Salva tutti gli esperimenti e le pagine di presentazione.

Se uno o più esperimenti o pagine di presentazione non sono già stati salvati in precedenza con il comando „Save" (Salva), per l'esperimento interessato una finestra di dialogo attenderà dapprima l'indicazione di un nome file e di una locazione di memoria.

Recent files (File recenti):
Apre uno dei file aperti per ultimi.
Print (Stampa):
Apre un dialogo per effettuare la stampa del contenuto della finestra attualmente attiva.
Exit (Esci):
Termina il programma.

Menu View (Visualizza)

Menu:
Con questa opzione si possono inserire o disinserire il menu TCS e il campo pulsanti (barra degli strumenti).
Statusbar (Barra di stato):
Questa opzione inserisce o disinserisce la presentazione della barra di stato al margine inferiore dell'interfaccia utente del software LCS.
Experiment Overview (panoramica esperimento):
Questa opzione apre una finestra in cui i singoli esperimenti e le loro parti (set di dati, grafi ecc.) vengono presentati secondo uno schema ad albero. Con un doppio clic sulla parte di esperimento desiderata all'interno della finestra Experiment Overview (panoramica esperimento), la finestra di visualizzazione corrispondente viene portata in primo piano.
Hardware Legend (Legenda Hardware):
Questa opzione inserisce o disinserisce la visualizzazione della Legenda hardware.

Menu Macro

Macros (Macro):
A seconda del software installato, con questa opzione si possono editare direttamente macro, oppure solamente registrarle ed avviarle.

Le macro possono essere anche editate e modificate soltanto quando l'intero ambiente di sviluppo integrato VBA (IDE) sia stato installato.

Run Macros (Esegui Macro):
Apre una finestra di dialogo contenente macro già definite. Da questa finestra di dialogo è possibile avviare macro.
Macro Interface Help (Guida Interfaccia Macro):
Avvia la Guida in linea per il linguaggio macro LCS.
Record a New Macro (Registra una nuova macro):
Avvia il registratore macro per la registrazione automatica di una macro.
È possibile ottenere ulteriori dettagli dalla documentazione compresa nella fornitura dell'ambiente di sviluppo macro opzionale.
Pause Recording (Pausa registrazione):
Interrompe la registrazione automatica di una macro.

Stop Recording (Arresta registrazione):
Arresta la registrazione automatica di una macro.
Visual Basic Editor (Editor di Visual Basic - opzionale):
Avvia il software di sviluppo di macro e programmi su base Visual Basic for Applications (Visual Basic per Applicazioni) (VBA). Qui si possono editare e modificare macro, e si possono sviluppare persino interi programmi.

Menu Tools (Strumenti)

Legend Info (Informazioni legenda):
Questa opzione apre la finestra di dialogo per l'inserimento di dati specifici dell'utente. Tali dati (p. es. nome dell'istituto, denominazione del campione ecc.) vengono salvati insieme con ciascun set di dati, e possono essere mostrati nella legenda accanto alle immagini acquisite.
Objective (Obiettivo):
Questa opzione apre la finestra di dialogo per la definizione degli obiettivi utilizzati. Gli obiettivi utilizzati possono essere copiati dalla lista disponibile nella finestra di dialogo tramite "Drag and Drop" (trascina e rilascia), e in questo modo essere resi riconoscibili dal software.

L'esatta indicazione dell'obiettivo è importante, in quanto alcune grandezze calcolate dipendono da essa, ad esempio le dimensioni del campo di scansione e l'adattamento automatico del diaframma di rilevamento a foro.

Microscope (Microscopio):
Questa opzione permette la scelta del microscopio Leica utilizzato. Detta scelta influisce sul modo di comando del microscopio (p. es. della torretta portaobiettivi motorizzata).
Stains (Coloranti):
Con questa opzione si possono inserire manualmente valori per le curve di colore.
Settings (Impostazioni):
Questa opzione permette di selezionare le impostazioni hardware che vanno rilevate all'apertura di un set di dati già salvato.
License (Licenza):
Con questa opzione si possono nuovamente installare licenze. Una licenza viene di solito installata nuovamente quando un pacchetto software offerto come opzione venga acquistato successivamente.

Menu Window (Finestra)

New Window (Nuova finestra):
Questa opzione apre una nuova finestra di visualizzazione all'interno dello stesso esperimento. In questo modo si può ad esempio visualizzare lo stesso set di dati contemporaneamente in diverse presentazioni (p. es. presentazione topografica e in sovrapposizione).

Menu Help (Guida)

Contents (Indice):
Apre il sommario della Guida in linea.
Search (Cerca):
Avvia la ricerca a tutto testo all'interno della Guida in linea.
Index (Indice):
Apre l'elenco di parole chiave della Guida in linea.
Tutorials (Guide introduttive):
Apre un tutorial in cui l'utente viene condotto passo dopo passo, tramite processi scelti.
Set Language (Imposta lingua):
Qui è possibile scegliere la lingua della Guida in linea.

Formati file LCS

Formati dati specifici dell'utente e dipendenti dall'apparecchio
Il software LCS dispone dei seguenti formati file per dati specifici dell'utente:

	Elenco: Leica	Elenco: User (Utente)
Valori strumenti (**I**nstrument **P**arameter **S**ettings - Impostazione Parametri Strumenti)	*.IPS	*.IPS
Macro	Company.mac	User.mac
Modelli per console di comando	*.pbo	*.pbo
Profili utente	CompanyProfile.pro	PersonalProfile.pro LastExitProfile.pro LastRecent.lst
Modelli	*.prt	*.prt
Dati di calibratura	Machine.lhw	
Tabelle di classificazione cromatica	*.lut	
Profilo utente specifico così come è stato definito nell'ultimo utilizzo		*.lst

In particolare, i diversi formati file contengono:

***.IPS**
In questo formato vengono salvati i parametri strumenti. Fra essi ricadono impostazioni di ambito hardware come l'intensità delle singole tracce laser, il numero di canali simultaneamente utilizzati, il tipo di divisore del fascio principale utilizzato, la posizione e l'ampiezza di banda dei singoli diaframmi spettrofotometrici e la sensibilità dei rivelatori. Vi sono poi set standard di parametri strumenti non modificabili, definiti dal produttore, che consentono un'impostazione molto rapida dell'hardware. L'utente può inoltre salvare per proprio conto set di parametri strumenti nel proprio indice utente. Con ciò è possibile salvare i parametri strumenti caratteristici del proprio ambito di applicazione, e tenerli a disposizione per altri esperimenti.
***.mac**
In questo formato vengono salvate le macro. Le macro contengono il codice programma VBA (**V**isual **B**asic for **A**pplication). I singoli oggetti del programma per il comando del sistema confocale vengono tenuti a disposizione da Leica in un modello a oggetti. È possibile ottenere ulteriori informazioni riguardo allo sviluppo di macro per il comando del sistema confocale dal capitolo "Il linguaggio macro LCS".
Insieme con il software, vengono comprese nella fornitura macro già predefinite dal produttore, che potranno essere utilizzare invariate o anche modificare. Le macro create autonomamente o modificate vengono salvate nella corrispondente lista utente specifica.
***.pbo**
In questo formato vengono salvati i modelli per lo schema della console di comando. Con questi modelli si può definire quale parametro di scansione venga controllato e da quale manopola. Anche in questo caso vi sono preimpostazioni del produttore, che sono risultate adeguate alla maggior parte delle applicazioni standard. Modelli definiti autonomamente vengono salvati nella lista utente specifica.
***.pro**
In questo formato vengono salvati profili specifici dell'interfaccia utente. In questo ambito si definisce quale tasto si trovi in quale posizione di quale barra degli strumenti. È inoltre possibile definire nuove barre degli strumenti e visualizzare o nascondere barre degli strumenti già definite. Anche la posizione della barra degli strumenti - sia essa ancorata o spostabile liberamente - viene fissata in un profilo. In questo modo, ciascun utente può progettare la sua personale interfaccia utente. Tramite questo strumento, i responsabili del sistema possono ad esempio progettare un'interfaccia utente specifica per ogni livello di apprendimento dell'utente (principianti, avanzati, esperti).
***.lst**
Nell'indice utenti vengono salvati, oltre ai singoli profili utente specifici, anche il profilo dell'ultimo

utilizzo e una lista con gli ultimi quattro set di dati utilizzati dall'utente.
***.prt**
In questo formato vengono salvati i modelli per la finestra di visualizzazione "Viewer" (visualizzatore). In questo modo si può fissare specificamente l'aspetto e il tipo delle informazioni presentate. È possibile ottenere una spiegazione delle singole possibilità di configurazione nel capitolo "Finestra di visualizzazione Viewer".
***.lhw**
In questo formato vengono fissati i dati di calibratura e le impostazioni hardware del sistema confocale. Questo file va elaborato esclusivamente da personale di servizio certificato da Leica Microsystems Heidelberg.

Modifiche effettuate in questo file possono comportare danni molto gravi al sistema confocale, in alcuni casi anche irreparabili. I danni derivanti in maniera dimostrabile da modifiche apportate dall'utente comportano la perdita della garanzia per l'intero sistema.

***.lut**
In questo formato vengono salvate le tabelle di classificazione cromatica. Con esse, i valori d'intensità misurati dai rivelatori vengono associati ciascuno ad un colore. In questo modo, oltre alla pura rappresentazione cromatica, possono essere estratti determinati campi d'intensità. È possibile ottenere ulteriori dettagli dal capitolo "Selezionare tabelle di classificazione cromatica".

Formati dati fissi specifici Leica

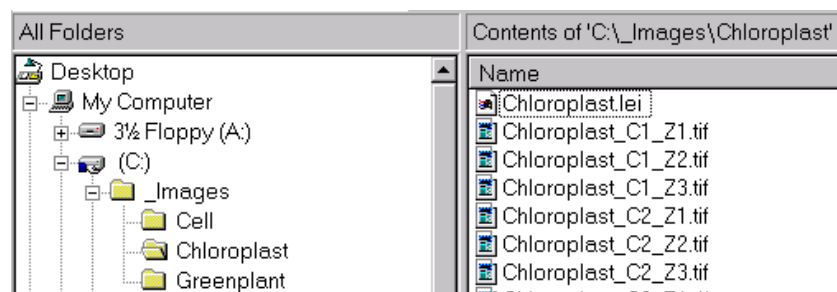
I seguenti formati file possono essere aperti e presentati nel Leica Confocal Software
Dati grezzi (*.raw)
Il formato RAW salva i dati come matrice bidimensionale in formato INTEL. L'indice a colonne della matrice corrisponde alla dimensione di scansione più veloce (generalmente l'asse x), l'indice per colonne corrisponde alla dimensione di scansione più lenta (generalmente l'asse y). Con un'immagine ad 8 bit, ogni grandezza viene salvata come un singolo byte. In un'immagine a 12 bit vengono utilizzati 2 byte, di cui, conformemente al formato INTEL (littel endian), il primo byte contiene i bit di valore maggiore. Ogni sezione ottica viene salvata per ogni canale in un file separato, con estensione .raw. La denominazione convenzionale è: *nome dell'esperimento_nome del set di dati_numero canale_dimensione z_numero sezione ottica*.raw
Esperimenti (*.lei)
Si tratta di un formato dati binario, specifico Leica. Detto formato è previsto per dati di esperimenti completi.
In questo formato file viene salvata una descrizione file che rimanda ad una serie di file immagine in formato TIFF o RAW.
File TIFF (*.tif)
Si tratta di file immagine Leica, nei formati Single e Multi-TIFF. Possono essere letti sia file immagine in formati TCS utilizzati in precedenza, sia file esterni in formato RGB-TIFF.
Annotazione (*.ano)
Anche in questo caso si tratta di un formato dati binario, specifico Leica. In esso vengono salvate le pagine di presentazione (Annotations - Annotazioni). Gli elementi inseriti nelle pagine di presentazione, come immagini, testi e grafiche, sono presenti ciascuno come singoli oggetti.

Sia che la grandezza salvata rappresenti un valore d'intensità, sia che si tratti di un valore di altezza, il salvataggio avviene nel relativo file LEI.

2^7	2^6	2^5	2^4	2^3	2^2	2^1	2^0	2^{15}	2^{14}	2^{13}	2^{12}	2^{11}	2^{10}	2^9	2^8
Byte di valore inferiore secondo il formato INTEL								Byte di valore superiore secondo il formato INTEL							

Rappresentazione di un numero a 12 bit nel formato INTEL

Specificazione del formato file "Lei" (Versione beta 2.000)

Non appena un file viene salvato nel software LCS, viene dapprima aggiunto un sottoelenco all'elenco attuale.
In tale sottoelenco vengono salvati:
1. Un file descrittivo, la cui struttura viene descritta qui di seguito. Esso serve ad interpretare i dati tramite il software LCS
2. I singoli file immagine; la denominazione dei file immagine segue il seguente schema logico:
NOME_numero canale_indice dimensione In questo modo, p. es., Chloroplast_C1_Z1 significa che il nome del set di dati "Chloroplast" attribuito dall'utente vuol dire che l'immagine corrisponde alla prima sezione ottica di una serie di dati tridimensionale (Z1), e che i dati sono stati acquisiti nel primo canale di rilevamento (C1).

Esempio di salvataggio di un esperimento in formato "Lei"

Struttura del file descrittivo

Il file descrittivo può essere letto solamente dal software LCS.
Esso consiste di un insieme di varie tabelle, ed ha la seguente struttura:

Tabella d'intestazione

Byte	Significato	Valori possibili
0 ... 3	Disposizione byte	0x49494949 Intel LSB 0x4D4D4D4D Motorola MSB
4 ... 7	Identificazione per formato Leica "Lei"	0x016033F0
8 ... 11	Numero di versione	attuale: =x20000000
12 ... 15	Indirizzo della tabella a elenco **A**	ogni indirizzo possibile nell'ambito della lunghezza complessiva del file

Tabella a elenco A

Indirizzo	Significato	Tipo di dati della voce
Indirizzo di **A** = A	Numero di voci in questa tabella	DWORD
A+4	Indice della prima voce (riproduce un blocco di memoria logico, p. es. parametri di ripresa ("Impostazioni hardware") o parametri fotografici ("Dimensioni")	DWORD
A+8	Indirizzo **A1** della prima voce	DWORD
A+12	Indice della prima voce (riproduce un blocco di memoria logico, p. es. parametri di ripresa ("Impostazioni hardware") o parametri fotografici ("Dimensioni")	DWORD
A+14	Indirizzo **A2** della seconda voce	DWORD
…	...	...

La lunghezza della tabella a elenco dipende da quante immagini e quanti dati immagine vadano salvati in un esperimento (parametri di ripresa, numero di canali, numero di sezioni ottiche ecc.). Ogni voce della tabella a elenco corrisponde perciò a un blocco di memoria logico.

Tabella blocco Xn

Indirizzo	Significato	Tipo di dati
A1 o A2 o A3.....A_i	Numero di controllo	DWORD
A_i+ 4 Byte	Descrizione del contenuto della tabella blocco (al momento non utilizzata)	DWORD
A_i+ 8 Byte	Versione della voce	DWORD
A_i+ 12 Byte	Grandezza della voce	DWORD
A_i+ 16 Byte	Inizio della voce	Il tipo di dati dipende dal tipo di voce

Sono disponibili i seguenti blocchi di memoria:

```
const DWORD    ID_SERIES       =   10;
const DWORD    ID_IMAGES       =   15;
const DWORD    ID_DIMDESCR     =   20;
const DWORD    ID_FILTERSET    =   30;
const DWORD    ID_TIMEINFO     =   40;
const DWORD    ID_SCANNERSET   =   50;
const DWORD    ID_EXPERIMENT   =   60;
const DWORD    ID_LUTDESC      =   70;
```

Per il tipo di dati DWORD è definito uno spazio di memoria di 32 bit

Blocco di memoria ID_SERIES

Questo blocco di dati contiene informazioni sulla grandezza della serie di dati completa racchiusa in un esperimento. Questo blocco di dati si forma sempre e soltanto una sola volta per ogni esperimento. Il blocco di dati è strutturato nel seguente modo:

Grandezza [byte]	Tipo di dati	Simbolo	Descrizione
4	int		Numero di versione interno
4	int	nSE	Numero di serie d'immagini
4	int	nIm	Lunghezza di un nome file in wchar
4	int	nExt	Lunghezza dell'estensione file del file immagine in byte
nExt	wchar		Estensione file del file immagine

Blocco di memoria ID_IMAGES
Questo blocco contiene tutti i nomi dei file immagine appartenenti a una serie. Il blocco di dati è strutturato nel seguente modo:

	4	int	nFiles	Numero di fotogrammi della serie
	4	int		Larghezza di un fotogramma
	4	int		Lunghezza di un fotogramma
	4	int		Bit / punto dati (Risoluzione dell'immagine)
	4	int		Punti dati / pixel (risoluzione della rappresentazione)
Per i prossimi *n* file immagine				
	nIm * 2	wchar		Nome dell'immagine successiva

Blocco di memoria ID_DIMDESCR
Questo blocco descrive come un'immagine viene descritta nello spazio n-dimensionale.

	Grandezza [byte]	**Tipo di dati**	**Simbolo**	**Descrizione**
	4	int		Numero di versione interno della descrizione VOXEL
	4	int		Tipo di voxel, p. es. RGB (Rosso-Verde-Blu) o GRAY (Grigio) (vedi tabella seguente: TIPI DI VOXEL)
	4	DWORD		Grandezza in byte di un pixel Tipicamente: (1 o 2) oppure (3 o 6 per RGB)
	4	DWORD		Risoluzione dei dati di scansione (8, 12 o 16 bit)
	4	int	nTC	Lunghezza della sequenza di caratteri seguente in wchar (wchar = **w**ide **char**acter; formato in caratteri testo che, al contrario del formato ASCII (1 Byte), utilizza una codifica a 2 byte dei caratteri testo
	nTC * 2	wchar		Valore massimo della grandezza (valore d'intensità o di lunghezza di una traccia) per un voxel
	4	int	nTC	Lunghezza della sequenza di caratteri seguente in wchar
	nTC * 2	wchar		Valore minimo della grandezza (valore d'intensità o di lunghezza di una traccia) per un voxel
	4	int	nTC	Lunghezza della sequenza di caratteri seguente in wchar
	nTC * 2	wchar		Identificazione della grandezza ("I" per intensità, "z" per valore di lunghezza)
	4	int		Numero di versione interno
	4	int	nDims	Dimensione dell'immagine, p. es. x_y_ch_z = 4
Per le prossime *n* dimensioni				
	4	DWORD		Numero identificativo (ID) della dimensione (vedi lista seguente: "Numeri identificativi (ID) per dimensioni immagini")
	4	DWORD		Grandezza della dimensione (p. es. 512 pixel)
	4	DWORD		Distanza fra le sottodimensioni (p. es. distanza in byte fra le serie di immagini di due numeri di canali successivi)
	4	int	nTC	Lunghezza della sequenza di caratteri seguente in wchar
	nTC * 2	wchar		Lunghezza fisica, con unità di lunghezza p. es. di 10 µm
	4	int	nTC	Lunghezza della sequenza di caratteri seguente in wchar
	nTC * 2	wchar		Posizione fisica di partenza, con unità di lunghezza p. es. di 10 µm
	4	int	nTC	Lunghezza della sequenza di caratteri seguente in byte
	nTC	wchar		Nome della serie di immagini
	4	int	nTC	Lunghezza della sequenza di caratteri seguente in byte
	nTC	wchar		Descrizione della serie di immagini

Numeri identificativi (ID) per dimensioni immagini

Sono possibili i seguenti numeri identificativi:

ID (decimale)	Significato
0	Indefinito
120	x
121	y
122	z
116	t per dimensione temporale
6815843	Numero canale
6357100	Lunghezza d'onda
7602290	Rotation
7798904	Ampiezza x per la tavola xy motorizzata
7798905	Ampiezza y per la tavola motorizzata xy
7798906	Ampiezza z per la tavola z
4259957	user1 (non specificato)
4325493	user2 (non specificato)
4391029	user3 (non specificato)
6357095	Valore grigio, p. es. dell'istogramma
6422631	Valore grigio 1, p. es. dell'istogramma
6488167	Valore grigio 2, p. es. dell'istogramma
6553703	Valore grigio 3, p. es. dell'istogramma
7864398	x logico (valore di posizione non fisico, ma logico)
7929934	y logico (valore di posizione non fisico, ma logico)
7995470	z logico (valore di posizione non fisico, ma logico)
7602254	t logico (valore di posizione non fisico, ma logico)
7077966	Valore di lunghezza d'onda logico (valore non fisico, ma logico)
7471182	Valore di rotazione logico (valore non fisico, ma logico)
5767246	Valore di ampiezza x logico (valore non fisico, ma logico)
5832782	Valore di ampiezza y logico (valore non fisico, ma logico)
5898318	Valore di ampiezza z logico (valore non fisico, ma logico)

Blocco di memoria ID_FILTERSET

Questo blocco di memoria descrive le impostazioni hardware, come ad esempio il diametro del foro stenopeico, oppure i filtri selezionati. Il blocco di memoria inizia con un'intestazione SAFEARRAY (Matrice di salvataggio), che descrive la quantità e la grandezza delle voci. Per una descrizione completa della struttura SAFEARRAY, vedi Appendice 1.
Al momento, vengono utilizzati solamente tre voci della struttura SAFEARRAY:

1. sa.cDims:
dovrebbe essere= 1. Al momento, vengono utilizzati solamente campi dati unidimensionali (matrici).
2. sa.cbElements:
grandezza degli elementi in byte
3. sa. rgsabound[0].cElements:
indica quanti elementi sono contenuti nella struttura

	Grandezza [byte]	Tipo di dati	Simbolo	Descrizione
	24	SAFEARRAY	sa	Tipo Microsoft, vedi Appendice 1
per tutti gli elementi contenuti nella struttura = sa.`rgsabound[0].cElements`				
	128	wchar		Contrassegno del contenuto della voce

	64	wchar		Nome di una descrizione abbreviata, p. es. una marcatura descrittiva tiff (tiff-tag)
	64	wchar		Sequenza di caratteri (qui si trova il contenuto della sequenza di caratteri)
	16	VARIANT		Contiene il tipo di dati ed il valore dati (ad eccezione del tipo dati "string" (sequenza di caratteri); quest'ultimo viene descritto nel campo in alto)
	4	DWORD		Spazio di memoria separato per valori dati
	4	DWORD		Non utilizzato
	4	DWORD		Contrassegno (ID) del blocco di memoria (solo per uso interno)
	4	DWORD		Valore di prova

Blocco di memoria ID_TIMEINFO
Questo blocco di memoria contiene marcatori temporali per serie di immagini che siano state acquisite con una modalità di scansione in funzione del tempo.

	Grandezza [byte]	Tipo di dati	Simbolo	Descrizione	
	4	int	nDims	Indica quante dimensioni comprenda la descrizione del marcatore temporale	
	4	int		Indica quale dimensione è stata provvista di marcatore temporale	
Per le prossime *n* dimensioni					
	4	DWORD		Contrassegno (ID) della dimensione (vedi descrizione del blocco di memoria D_DIMDESCR)	
	4	DWORD		Grandezza della dimensione (numero elementi p. es. 512 pixel)	
	4	DWORD		Distanza fra le singole voci dimensioni	
	4	int	nTS	Numero dei marcatori temporali	
Per i prossimi *n* marcatori temporali = nTS					
	64	wchar		Marcatore temporale come sequenza di caratteri (tipo dati "string" - sequenza di caratteri)	
	4	int	nTM	Numero marcature temporali per marcatore temporale	
Per le prossime *m* marcature temporali = nTM					
		4	int	nC	Numero di dimensioni della descrizione a marcatori temporali
	loop nC				
		4	int		Coordinata in questa dimensione
		64	wchar		Marcatura temporale come sequenza di caratteri (tipo dati wchar)

Esempio:

Immagine con le seguenti dimensioni e grandezze dimensionali:

x	y	ch	z
512	512	3	10

La descrizione di una marcatura temporale è p. es. 512_512_3_10. Tale descrizione si accorda esattamente alla descrizione dell'immagine. Una descrizione a marcatori temporali 1024_1024_3_10

per l'immagine di esempio in alto significa che l'immagine originale aveva una dimensione xy di 1024*1024, e che è stata ridotta tramite software (downsampling - riduzione di campionamento). In questi casi, la marcatura temporale va nuovamente calcolata in maniera corrispondente.
Una marcatura temporale può essere definita in qualsiasi momento durante un processo di acquisizione dati n-dimensionale (scansione). Una coordinata di una marcatura temporale di 0_0_2_7 significa che la marcatura temporale è stata posta all'inizio di un set di dati (0_0_c_#) nel secondo canale (0_0_2_#) per la settima sezione ottica (0_0_2_7).

Blocco di memoria ID_SCANNERSET
Questo blocco di memoria contiene i parametri di apparecchio che vengono impostati al momento dell'acquisizione dell'immagine.
È possibile trovare ulteriori dettagli riguardo alla struttura SAFEARRAY nella descrizione del blocco di memoria ID_FILTERSET.

	Grandezza [byte]	Tipo di dati	Simbolo	Descrizione
	24	SAFEARRAY	sa	Tipo Microsoft, vedi Appendice
per tutti gli elementi contenuti nella struttura = sa.`rgsabound[0].cElements`				
	128	wchar		Contrassegno del contenuto di questa voce
	64	wchar		Nome di una descrizione abbreviata, p. es. in marcatura descrittiva tiff (tiff-description-tag)
	64	wchar		Sequenza di caratteri (qui si trova il contenuto della sequenza di caratteri)
	20	VARIANT		Contiene il tipo di dati ed il valore dati (ad eccezione del tipo dati "string" (sequenza di caratteri); quest'ultimo viene descritto nel campo in alto)
	4	DWORD		Spazio di memoria separato per valori dati
	4	DWORD		Non utilizzato
	4	DWORD		Contrassegno (ID) del blocco di memoria (solo per uso interno)
	4	DWORD		Valore di prova

Blocco di memoria ID_EXPERIMENT
Descrizione del formato di salvataggio (p. es.“*.lei file with PC-Tiff images” - "File *.lei con immagini PC-Tiff")

	Grandezza [byte]	Tipo di dati	Simbolo	Descrizione
	4	int		Numero di versione interno
	4	int		Numero di immagini nell'insieme di dati dell'esperimento
	4	int	nTC	Lunghezza della sequenza di caratteri seguente in wchar
	nTC * 2	wchar		Descrizione abbreviata del formato
	4	int	nTC	Lunghezza della sequenza di caratteri seguente in wchar
	nTC * 2	wchar		Estensione file del file principale
	4	int	nTC	Lunghezza della sequenza di caratteri seguente in wchar
	nTC * 2	wchar		Contrassegno del formato fotogramma (p. es. PC-TIFF)
	4	int	nTC	Lunghezza della sequenza di caratteri seguente in wchar
	nTC * 2	wchar		Estensione file per il formato fotogramma (p. es. tif / raw)

Blocco di memoria ID_LUTDESC
Descrizione delle tabelle di classificazione cromatica (LUT's)

	Grandezza [byte]	Tipo di dati	Simbolo	Descrizione
	4	int	nLU	Numero di canali
	4	DWORD		Contrassegno (ID) della dimensione la cui rappresentazione viene colorata
Per i canali successivi sino a = nLU				
	4	int		Numero di versione interno
	1	bool		bool IsInverted
	4	int	nTC	Lunghezza della sequenza di caratteri seguente in byte
	nTC	wchar		Descrizione della tabella di classificazione cromatica (LUT)
	4	int	nTC	Lunghezza della sequenza di caratteri seguente in byte
	nTC	wchar		Nome file della tabella di classificazione cromatica (se presente)
	4	int	nTC	Lunghezza della sequenza di caratteri seguente in byte
	nTC	wchar		Nome della tabella di classificazione cromatica
	4	int		Campo per utilizzo interno
	4	int		Dimensione della tabella di classificazione cromatica

SAFEARRAY Data Type (Tipo dati a matrice di salvataggio)

```
typedef struct FARSTRUCT tagSAFEARRAY {
    unsigned short cDims;         // Count of dimensions in this array
    unsigned short fFeatures;     // DON'T CARE
    unsigned long cbElements;     // Size of an element of the array.
                                  // Does not include size of
                                  // pointed-to data.
    unsigned long cLocks;         // DON'T CARE
    void HUGEP* pvData;           // Pointer to the data.
    SAFEARRAYBOUND rgsabound[1];  // One bound for each dimension.
} SAFEARRAY;
```

Il formato file specifico Leica "LEI" utilizza solamente campi dati unidimensionali (matrici).

Struttura *SAFEARRAYBOUND (Limite matrice di salvataggio)*
Rappresenta i limiti di una dimensione della matrice. Il limite inferiore della dimensione è rappresentato da `lLbound`, e `cElements` rappresenta il numero di elementi nella dimensione. La struttura viene definita come segue:

```
typedef struct tagSAFEARRAYBOUND {
    unsigned long cElements;          // num of elements
    long lLbound;                     // DON'T CARE
} SAFEARRAYBOUND;
```

VARIANT e VARIANTARG

```
typedef struct FARSTRUCT tagVARIANT VARIANT;
```

```
typedef struct tagVARIANT  {
    VARTYPE vt;
    unsigned short wReserved1;
    unsigned short wReserved2;
    unsigned short wReserved3;
    union {
        unsigned char      bVal;            // VT_UI1.
        short              iVal;            // VT_I2    .
        long               lVal;            // VT_I4    .
        float              fltVal;          // VT_R4    .
        double             dblVal;          // VT_R8    .
        VARIANT_BOOL       boolVal;         // VT_BOOL.
        SCODE              scode            // VT_ERROR.
        CY                 cyVal;           // VT_CY    .
        DATE               date;            // VT_DATE.
        BSTR               bstrVal;         // VT_BSTR.
        IUnknown           FAR* punkVal;    // VT_UNKNOWN.
        IDispatch          FAR* pdispVal;   // VT_DISPATCH.
        SAFEARRAY          FAR* parray;     // VT_ARRAY|*.
        unsigned char      FAR* pbVal;      // VT_BYREF|VT_UI1.
        short              FAR* piVal;      // VT_BYREF|VT_I2.
        long               FAR* plVal;      // VT_BYREF|VT_I4.
        float              FAR* pfltVal;    // VT_BYREF|VT_R4.
        double             FAR* pdblVal;    // VT_BYREF|VT_R8.
        VARIANT_BOOL       FAR* pboolVal;   // VT_BYREF|VT_BOOL.
        SCODE              FAR* pscode;     // VT_BYREF|VT_ERROR.
        CY                 FAR* pcyVal;     // VT_BYREF|VT_CY.
        DATE               FAR* pdate;      // VT_BYREF|VT_DATE.
        BSTR               FAR* pbstrVal;   // VT_BYREF|VT_BSTR.
        IUnknown FAR*      FAR* ppunkVal;   // VT_BYREF|VT_UNKNOWN.
        IDispatch FAR*     FAR* ppdispVal;  // VT_BYREF|VT_DISPATCH.
        SAFEARRAY FAR*     FAR* pparray;    // VT_ARRAY|*.
        VARIANT            FAR* pvarVal;    // VT_BYREF|VT_VARIANT.
        void               FAR* byref;      // Generic ByRef.
     };
};
```

Nei file con formato "LEI", gli indicatori non vengono mai utilizzati come parametri.

VARTYPE

```
typedef unsigned short VARTYPE;
enum VARENUM{
    VT_EMPTY       = 0,           // Not specified.
    VT_NULL        = 1,           // Null.
    VT_I2          = 2,           // 2-byte signed int.
    VT_I4          = 3,           // 4-byte signed int.
    VT_R4          = 4,           // 4-byte real.
    VT_R8          = 5,           // 8-byte real.
    VT_CY          = 6,           // Currency.
    VT_DATE        = 7,           // Date.
    VT_BSTR        = 8,           // Binary string.
    VT_DISPATCH    = 9,           // IDispatch
    VT_ERROR       = 10,          // Scodes.
    VT_BOOL        = 11,          // Boolean; True=-1, False=0.
    VT_VARIANT     = 12,          // VARIANT FAR*.
    VT_UNKNOWN     = 13,          // IUnknown FAR*.
    VT_UI1         = 17,          // Unsigned char.

    // Other constants that are not valid in VARIANTs omitted here.

};
    VT_RESERVED    = (int) 0x8000
    // By reference, a pointer to the data is passed.
    VT_BYREF       = (int) 0x4000
    VT_ARRAY      = (int) 0x2000    // A safe array of the data is passed.
```

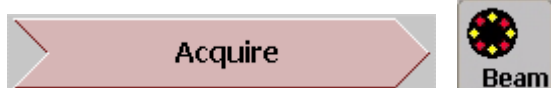
Il valore vt definisce l'interpretazione dei dati dell'esperimento come segue:

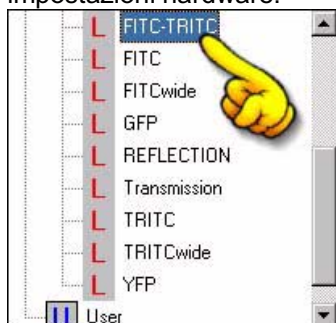
Valore	**Descrizione**
VT_EMPTY	Non è stato indicato alcun valore
VT_UI1	Un carattere da 1 byte non denominato è stato salvato in *bVal*.
VT_I2	Un valore a cifra intera da 2 byte (integer - numero intero) è stato salvato in *iVal*.
VT_I4	Un valore a cifra intera da 4 byte (integer - numero intero) è stato salvato in *lVal*.
VT_R4	Un valore IEEE a cifra mobile da 4 byte (real value - valore effettivo) è stato salvato in *fltVal*.
VT_R8	Un valore IEEE a cifra mobile da 8 byte (real value - valore effettivo) è stato salvato in *dblVal*.
VT_CY	È stato indicato un valore a virgola fissa. Il valore a virgola fissa consiste di 15 posizioni prima della virgola, e di 4 posizioni dopo la virgola. Il valore è stato salvato in *cyVal*.
VT_BSTR	Eccezione per file in formato Lei: Una sequenza di caratteri è stata salvata nelle variabili TCHAR
VT_NULL	È stato indicato un valore zero mobile. Lo zero mobile non è perciò un vettore ZERO. Detto valore è necessario per una logica a tre stati, come p. es. nel linguaggio di interrogazione banche dati SQL.
VT_ERROR	È stato indicato un errore SCODE. Il tipo di errore è specificato in *scodee*.
VT_BOOL	È stata indicata una grandezza booleana (vero / falso). Il valore 0xFFFF (tutti i bit=1) significa "vero"; il valore 0 (tutti i bit=0) significa "falso".
VT_DATE	È stato indicato un valore corrispondente a una data. È stata salvata una data come cifra in formato double-precision (a doppia precisione). Tutte le date vengono salvate come giorni di differenza dal 1° Gennaio 1900. La voce "25" corrisponde, ad esempio, al 25/01/1900.

Modalità procedurali ed esercizi di procedure scelte

Impostare i parametri di ripresa per la prima acquisizione immagini

1° passo

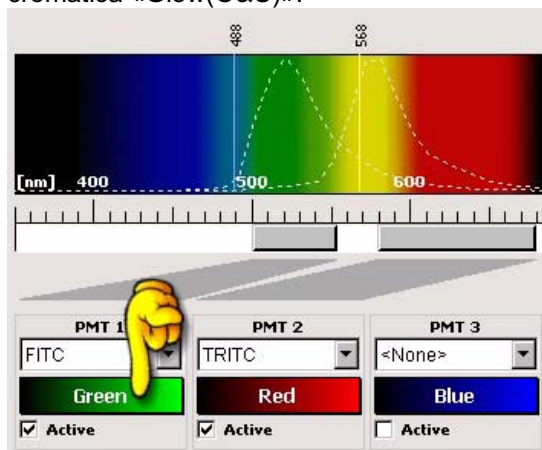
Fare clic sul simbolo a freccia «**Acquire**» (Acquisizione) ed aprire con il tasto «Beam» (Raggio) la finestra di dialogo «Beam Path Setting» (Impostazione percorso raggio).

2° passo

Fare doppio clic in questa finestra di dialogo nel campo d'elenco in alto a destra su un **Set di parametri di ripresa (IPS)**, per effettuare il caricamento di importanti impostazioni hardware.

Che cos'è un set di parametri di ripresa?

Un set di parametri di ripresa (IPS: **I**nstrument **P**arameter **S**etting = impostazione parametri strumento) è un file in cui vengono salvate tutte le impostazioni hardware specifiche di una data tecnica di ripresa. «FITC-TRITC», ad esempio, indica le impostazioni per una ripresa a due canali, con i due coloranti fluorescenti FITC e TRITC. Con un set di parametri di ripresa è possibile salvare in un file impostazioni hardware ottimizzate e ricaricarle con un semplice doppio clic. I set di parametri di ripresa contrassegnati con una «**L**» sono predefiniti da Leica e nono sono modificabili. Set di parametri di ripresa definiti dall'utente ed editabili vengono salvati nell'albero di directory sotto «**U**» .

& vedi capitolo „Come creare set di parametri di ripresa (IPS) generati dall'utente“ (pagina 73)

3° passo

Associare ad ogni **canale di rilevamento «PMT»** attivo la tabella di classificazione cromatica «Glow(O&U)».

▶Fare clic sul simbolo della tabella di classificazione cromatica

▶Fare clic su «Glow (OU)».

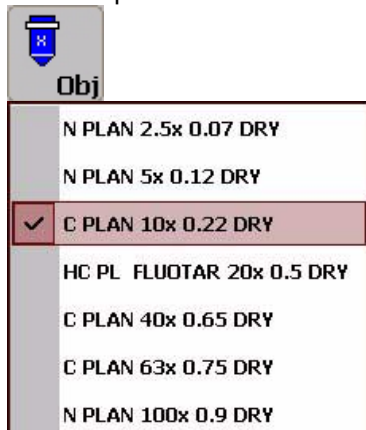
Avvertenza sulla qualità dell'immagine

La tabelle di classificazione cromatica «Glow (O&U)» visualizza i valori massimi in blu ed i valori minimi in verde. Essa è perciò adatta al meglio all'ottimizzazione della qualità dell'immagine. Nel passo 12 viene descritto come sia possibile ottimizzare, con l'ausilio di questa tabella di classificazione cromatica, il campo dei valori d'intensità di un'immagine per la presentazione sul monitor.

4° passo

Prima di iniziare con l'ottimizzazione della qualità immagine, verificare le impostazioni standard dei parametri di ripresa citati qui di seguito nei passi da 5 a 9, i quali non potranno più essere modificati durante l'acquisizione dell'immagine.

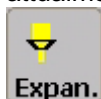
5° passo

Fare clic sul tasto «**Objective**» (Obiettivo) e selezionare nella lista un obiettivo del microscopio.

Nel caso non appaia alcuna voce nella lista, gli obiettivi del microscopio vanno classificati secondo i punti d'innesto della torretta portaobiettivi.

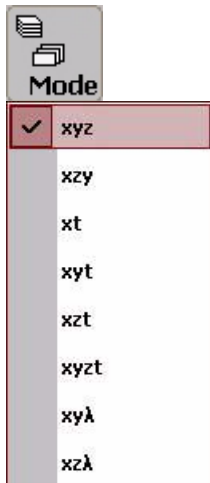
▶Leggere a questo riguardo la descrizione della Guida del tasto «Objective» (Obiettivo), premendo dapprima sul tasto «Help» (Guida), quindi su «Objective».

Avvertenza sulla qualità dell'immagine

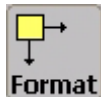
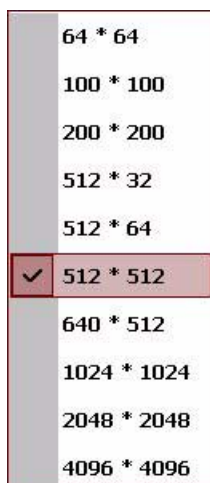
L'apertura numerica dell'obiettivo del microscopio determina la risoluzione dell'immagine, vale a dire la distanza minima fra due punti dell'oggetto che possano ancora essere rappresentati come punti separati nell'immagine. Gli obiettivi ad ingrandimento più marcato hanno anche un maggiore potere risolvente.

Con l'espansione del raggio (tasto «Beam Expander» (Espansione raggio)) è possibile adattare in maniera ottimale il diametro del raggio laser alla lente dell'obiettivo attualmente utilizzato.

L'impostazione standard «Beam Exp 6» (Esp. raggio 6) è quella ottimale nella maggior parte dei casi. Con l'utilizzo di laser a bassa potenza e di obiettivi ad elevata risoluzione, è possibile migliorare ulteriormente l'illuminazione della lente dell'obiettivo utilizzando un'espansione del raggio più ridotta.

6° passo

Fare clic sul tasto «**Mode**» (Modalità) e selezionare una modalità di scansione.

Con la modalità scansione si determina la dimensionalità dell'acquisizione immagine È possibile scegliere fra le serie immagini spaziali «xyz, xzy», le serie immagini temporali «xt, xyt, xzt, xyzt» e le serie immagini spettrali «xyλ, xzλ».

7° passo

Fare clic sul tasto «**Format**» (Formato) e selezionare un formato di scansione.

Avvertenza sulla qualità dell'immagine

Il formato di scansione determina il numero di punti con cui lo scanner scansisce il preparato, e quindi il numero di pixel dell'immagine. Quanto maggiore sarà il formato di scansione in un dato campo di scansione, tanto minore sarà la distanza fra i punti di scansione, e quindi migliore la risoluzione dell'immagine.

8° passo

Fare clic sul tasto «**Speed**» (Velocità) e selezionare la velocità di scansione.

Con la velocità di scansione si stabilisce quante righe immagine al secondo vengono scansite dallo scanner.

Avvertenza sulla qualità dell'immagine

Con la velocità di scansione si influisce sulla qualità dell'immagine. Quanto minore sarà la velocità di scansione in un dato formato di scansione, tanto migliore sarà il rapporto segnale/rumore dell'immagine.

È inoltre possibile raddoppiare la velocità di scansione attivando, tramite il tasto «Scan» (Scansione), la scansione bidirezionale.

Nella scansione bidirezionale viene utilizzata per la scansione non solo la corsa in avanti dello scanner, ma anche quella di ritorno.

9° passo

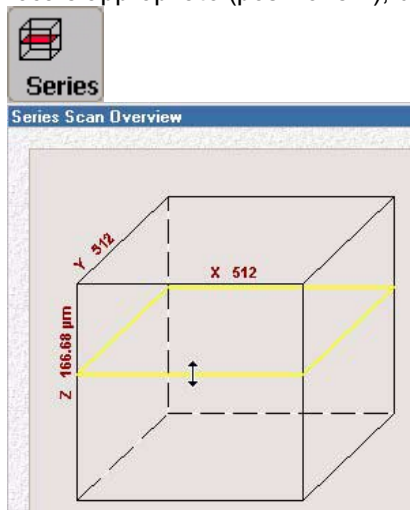
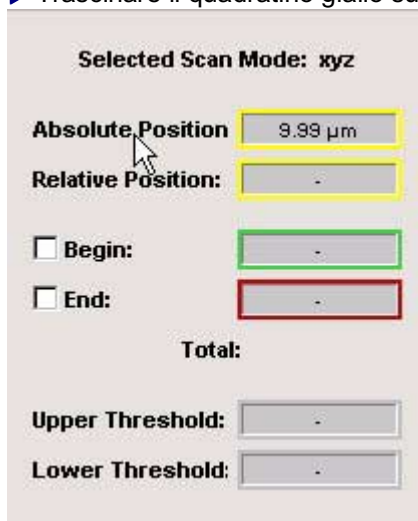
Fare clic sul tasto«**Bit**» e selezionare la profondità di bit.

Con 8 bit è possibile acquisire 256 differenti valori d'intensità, con 12 bit i valori sono 4096.

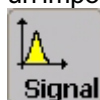
10° passo

Avviare ora con il tasto «**Continuous**» (Continua) l'acquisizione immagini in scansione continua, per ottimizzare la qualità dell'immagine durante l'acquisizione dell'immagine stessa.

11° passo

Fare clic sul tasto «**Series**» (Serie) e selezionare per l'acquisizione immagini un piano focale appropriato (posizione Z), di norma il punto più luminoso del preparato.

▶Trascinare il quadratino giallo sulla posizione Z desiderata, **oppure**

▶Fare doppio clic su «Absolute Position» (Posizione assoluta) ed inserire un valore.

Avvertenza per l'individuazione del piano focale

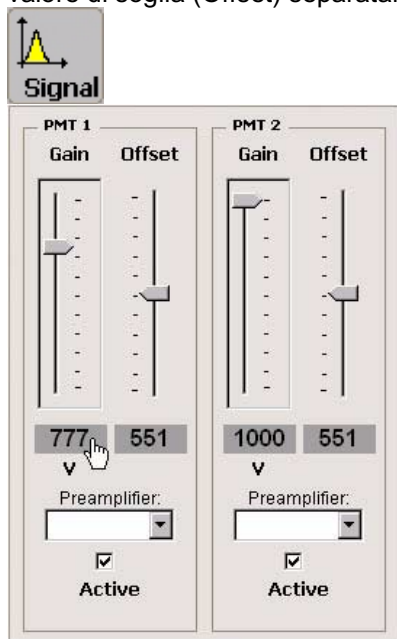
Nel caso si abbia difficoltà ad individuare il piano focale, ciò potrebbe essere causato da un'impostazione non corretta dell'amplificazione segnale dei rivelatori.

▶Fare clic sul tasto «Signal» (Segnale) ed impostare il valore «Gain» (Guadagno) dei canali di rilevamento attivi sul massimo numero di Volt.

Diversi parametri di ripresa possono essere impostati più rapidamente e con maggiore comodità tramite la console di comando piuttosto che con i tasti.

& vedi capitolo „Come impostare i parametri di ripresa tramite la console di comando“

(pagina 79)

12° passo

Fare clic sul tasto «**Signal**» (Segnale) ed impostare l'amplificazione segnale (Gain) ed il valore di soglia (Offset) separatamente per ciascun rivelatore utilizzato (PMT).

▶Trascinare il regolatore a scorrimento o fare doppio clic sulla cifra ed immettere un numero.

▶Impostare il valore «Gain» (Guadagno) in modo tale che le zone più luminose dell'immagine (struttura) vengano rappresentate in blu.

▶Impostare il valore «Offset» in modo tale che le zone oscura dell'immagine (sfondo) vengano rappresentate in verde. Come regola orientativa vale che circa la metà dello sfondo dovrebbe essere rappresentata in verde.

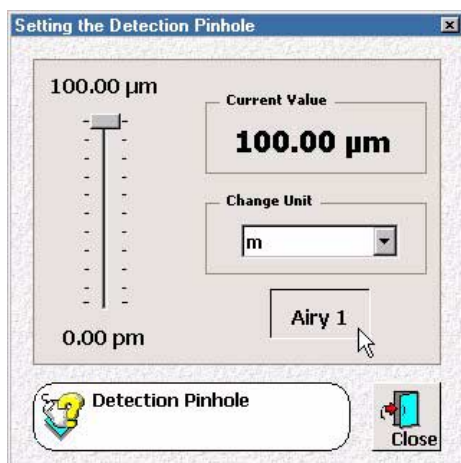
Avvertenza sulla qualità dell'immagine

L'adattamento dei parametri di rilevamento sul preparato assicura che il campo valori d'intensità dell'acquisizione immagini venga coordinato al campo valori digitale e visualizzato in maniera ottimale.

Diversi parametri di ripresa possono essere impostati più rapidamente e con maggiore comodità tramite la console di comando piuttosto che con i tasti.

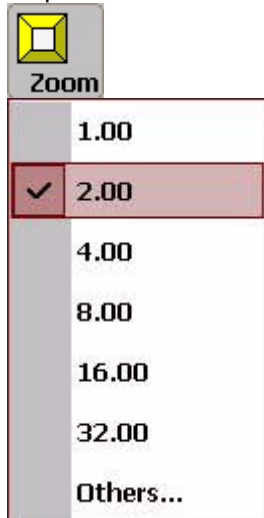
& vedi capitolo „Come impostare i parametri di ripresa tramite la console di comando“ (pagina 79)

13° passo

Fare clic sul tasto «**Pinhole**» (Foro stenopeico) ed impostare il diaframma di rilevamento a foro su una unità di Airy.

Avvertenza sulla qualità dell'immagine
Il diaframma di rilevamento a foro è determinante per la risoluzione dell'immagine. Con l'impostazione del diaframma di rilevamento a foro su un'unità di Airy ci si assicura che lo spessore di una sezione ottica sia minimo, e che si ottenga con ciò la massima risoluzione nella dimensione z dell'immagine.

Diversi parametri di ripresa possono essere impostati più rapidamente e con maggiore comodità tramite la console di comando piuttosto che con i tasti.
& vedi capitolo „Come impostare i parametri di ripresa tramite la console di comando“ (pagina 79)

14° passo

Fare clic sul tasto «**Electronic Zoom**» (Zoom elettronico) e ingrandire il campo che va acquisito.

Avvertenza sulla qualità dell'immagine
Con lo Zoom elettronico è possibile migliorare la risoluzione dell'immagine. Se per esempio è selezionato il fattore d'ingrandimento 2,00, viene scansito solamente un quarto del campo di scansione massimo. Con un dato formato di scansione, si riduce in questo modo la distanza fra i punti di scansione, e la risoluzione risulta migliore.

Diversi parametri di ripresa possono essere impostati più rapidamente e con maggiore comodità tramite la console di comando piuttosto che con i tasti.
& vedi capitolo „Come impostare i parametri di ripresa tramite la console di comando“

(pagina 79)

15° passo

Fare clic sul tasto «**Continuous**» (Continua) per terminare l'acquisizione immagini in scansione continua.

1

Ora che sono stati impostati tutti i parametri di ripresa di maggiore importanza, è possibile proseguire con la ripresa di fotogrammi o di serie di immagini.

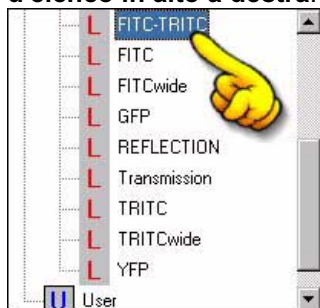
{tc "Creare set di parametri di ripresa (IPS) generati dall'utente"}

Creare set di parametri di ripresa (IPS) generati dall'utente

1° passo

Fare clic sul simbolo a freccia «**Acquire**» (Acquisizione) ed aprire con il tasto «Beam» (Raggio) la finestra di dialogo «Beam Path Setting» (Impostazione percorso raggio).

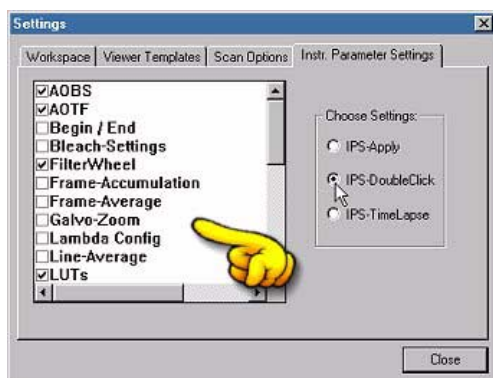
2° passo

In questa finestra di dialogo vengono visualizzati i set di parametri di ripresa **nel campo d'elenco in alto a destra**.

Che cos'è un set di parametri di ripresa?

Un set di parametri di ripresa (IPS: **I**nstrument **P**arameter **S**etting = impostazione parametri strumento) è un file in cui vengono salvate tutte le impostazioni hardware specifiche di una data tecnica di ripresa. «FITC-TRITC», ad esempio, indica le impostazioni per una ripresa a due canali, con i due coloranti fluorescenti FITC e TRITC. Con un set di parametri di ripresa è possibile salvare in un file impostazioni hardware ottimizzate e ricaricarle automaticamente con un doppio clic. I set di parametri di ripresa contrassegnati con una «**L**» sono predefiniti da Leica e nono sono modificabili. Set di parametri di ripresa definiti dall'utente ed editabili vengono salvati nell'albero di directory sotto «**U**» .

3° passo

Selezionare «**Tools\ Settings\ Instr. Parameter Settings**» (Strumenti\Impostazioni\ Impostazioni parametri strumenti) e stabilire dapprima i parametri che vanno considerati al caricamento del nuovo set di parametri di ripresa.

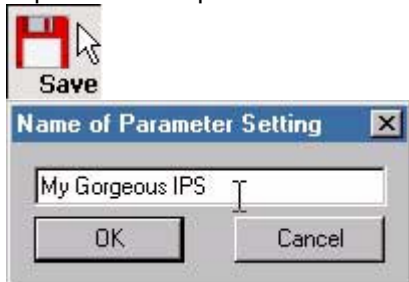
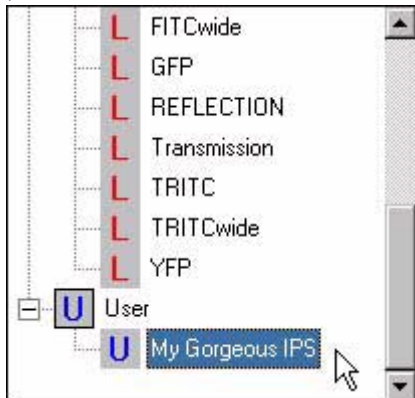
▶Selezionare «Tools\ Settings\ Instr. Parameter Settings».

▶Nel campo d'elenco sono già scelti alcuni parametri standard, che si possono modificare soltanto volontariamente. Scegliere l'opzione «IPS-DoubleClick» (IPS-Doppio clic) e contrassegnare i parametri di ripresa supplementari desiderati.

4° passo

Per adattare i parametri di ripresa al preparato utilizzato al momento durante l'acquisizione immagini, avviare con il tasto «**Continuous**» l'acquisizione immagini in scansione continua.

& vedi capitolo „Impostare i parametri di ripresa per la prima acquisizione immagini“ (pagina 65)

5° passo

Fare clic nella finestra di dialogo «Beam Path Setting» (Impostazione percorso raggio) sul pulsante «**Save**» (Salva) per salvare le impostazioni parametri modificate come set di parametri di ripresa.

▶Attribuire un nome al nuovo set di parametri di ripresa e fare clic su OK.

Il nuovo set di parametri di ripresa appare nel campo d'elenco sotto «**U**». Sempre facendo doppio clic su «My Gorgeous IPS» (Migliore IPS) vengono caricate tutte le impostazioni hardware salvate sotto questo set di parametri di ripresa.

Dove vengono salvati i set di parametri di ripresa?

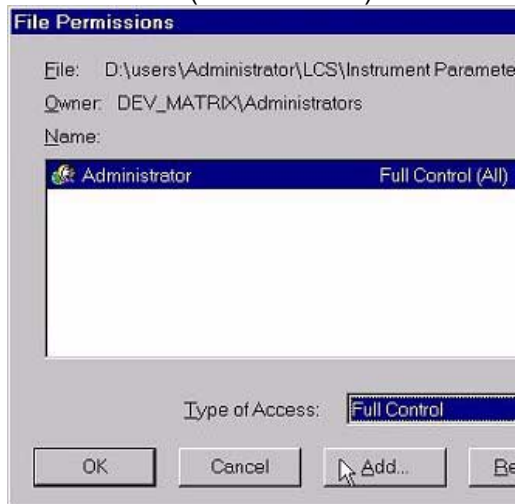
I set di parametri di ripresa definiti dall'utente vengono salvati nell'indice dell'utente attualmente segnalato sotto Windows NT. Nell'impostazione standard, l'indice dell'utente si trova in D:\users\... L'accesso ad un set di parametri di ripresa è perciò consentito esclusivamente all'utente che lo ha creato. Nel caso in cui più utenti debbano avere accesso ad un set di parametri definito dall'utente, detto accesso va abilitato ad altri utenti da parte del produttore o dall'amministratore di rete.

6° passo

È possibile consentire ad altri utenti l'**accesso** al proprio set di parametri di ripresa.

▶Aprire in Windows Explorer l'elenco in cui sono stati salvati i set di parametri di ripresa. Nell'impostazione standard esso si trova, ad esempio per un utente segnalato come amministratore, in D:\ users\ Administrator\ Lcs\ Instrument Parameter Settings\...

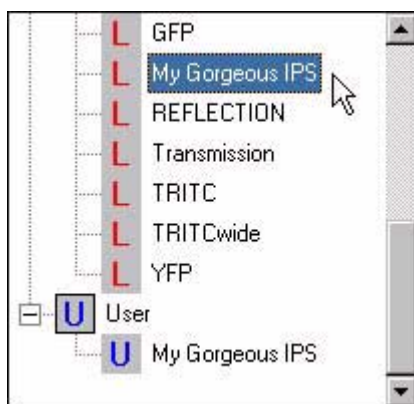
▶Evidenziare il set di parametri di ripresa, aprire con il tasto destro del mouse il menu contestuale e selezionare «Properties» (Proprietà).

▶Fare clic in questa finestra di dialogo sul registro «Security» (Sicurezza), e quindi su «Permissions» (Autorizzazioni).

▶Fare clic nella finestra di dialogo «File Permissions» (Autorizzazioni file) sul pulsante «Add..» (Aggiungi...) per selezionare gli utenti che devono ricevere un diritto di accesso.

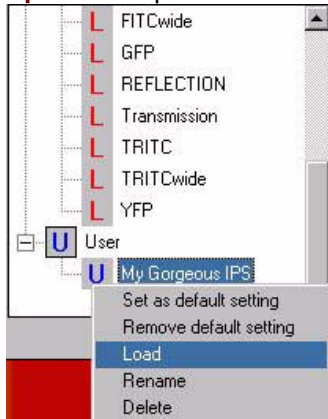
▶Selezionare nel campo «Names» (Nomi) gli utenti desiderati, ad esempio «Everyone» (Tutti), e fare clic su «Add» (Aggiungi).

▶Attribuire al nuovo utente, nel campo d'elenco «Type of Access» (Tipo di accesso), lo stato di diritto «Full Access» (Accesso completo) e chiudere la finestra di dialogo con «OK».

▶Copiare in Windows Explorer il file del set di parametri di ripresa nella cartella C:\Program files\ Leica\ Lcs\ Instrument Parameter Settings\...

Importante: per questa operazione utilizzare il comando «Copia» e non il comando «Taglia».

Alla prossima apertura della finestra di dialogo «Beam Path Setting» (Impostazione percorso raggio), il set di parametri di ripresa verrà visualizzato sotto «**L**», e sarà quindi accessibile a tutti gli utenti.

7° passo

Per avere a disposizione comandi opzionali, evidenziare il **nuovo set di parametri di ripresa** ed aprire il menu contestuale con il tasto destro del mouse.

▶Selezionare «Set as default setting» (Imposta come impostazione predefinita) nel caso in cui il set di parametri vada caricato come standard all'apertura del software.

▶Selezionare «Remove default setting» (Rimuovi impostazione predefinita) per annullare l'impostazione come set di parametri standard.

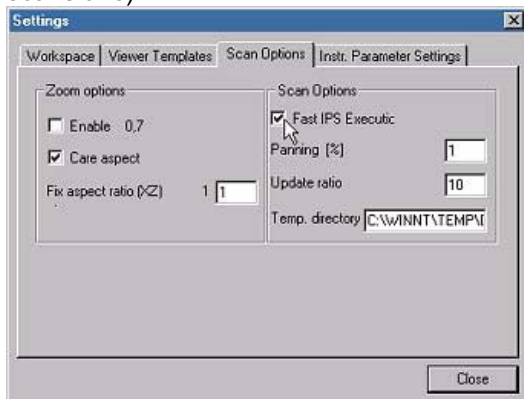
▶Selezionare «Load» (Carica) per caricare il set di parametri.

▶Selezionare «Rename» (Rinomina) per attribuire un nuovo nome al set di parametri.

▶Selezionare «Delete» (Cancella) per cancellare il set di parametri.

8° passo

Se la **velocità** a cui viene caricato il set di parametri di ripresa dovesse essere eccessivamente bassa, è possibile attivare una modalità rapida.

▶Selezionare «Tools\ Settings\ Scan Options» (Strumenti\Impostazioni\Opzioni scansione).

▶Attivare la modalità rapida selezionando con un clic la casella di spunta «Fast IPS Execution» (Esecuzione IPS rapida).

Avvertenza

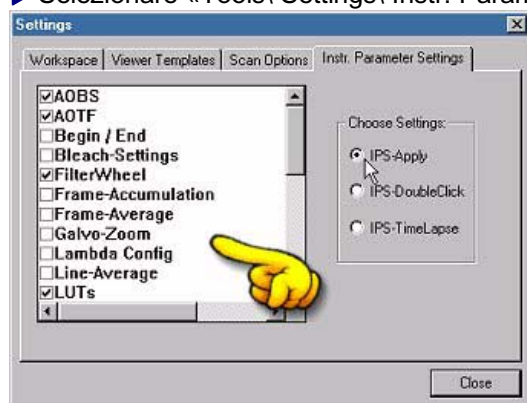
Nel caso si aprano set di parametri di ripresa che non siano stati creati con la versione attualmente utilizzata del Leica Confocal Software, in alcuni casi l'utilizzo della modalità

rapida potrebbe non essere possibile. In tale caso si riceverà un avviso di errore, ed occorrerà riavviare il sistema.

9° passo

Per riutilizzare le impostazioni parametri di ripresa di un esperimento già esistente per una nuova acquisizione immagini, aprire l'esperimento e fare clic sul tasto «**Apply**» (Applica).

▶Selezionare «Tools\ Settings\ Instr. Parameter Settings» (Strumenti\Impostazioni\ Impostazione Parametri Strumento) e stabilire i parametri di ripresa che vanno acquisiti azionando il tasto «Apply».

▶Selezionare «Tools\ Settings\ Instr. Parameter Settings».

▶Nel campo d'elenco sono già scelti alcuni parametri standard, che si possono modificare soltanto volontariamente. Scegliere l'opzione «IPS-Apply» (IPS-Applica) e contrassegnare i parametri di ripresa supplementari desiderati.

{tc "Impostare i parametri di ripresa tramite la console di comando"}

Impostare i parametri di ripresa tramite la console di comando

1° passo

Diversi parametri di ripresa possono essere impostati più rapidamente e con maggior comodità tramite la **console di comando** piuttosto che con i tasti del software.

Diversi parametri di ripresa possono essere associati alle sette manopole della console di comando, per poterli poi comandare dalla console di comando stessa.

Avvertenza

La barra di stato della console di comando viene visualizzata al margine inferiore dell'interfaccia operatore. Nel caso ciò non accada, selezionare «View\ Status Bars\ Control Panel Status Bar» (Visualizza\Barre di stato\Barra di stato Pannello di controllo).

2° passo

Caricare una **disposizione predefinita** delle manopole della console di comando.

▶I tre piccoli pulsanti per la configurazione della console di comando si trovano al margine destro della barra di stato della console di comando.

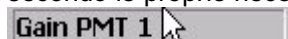
▶Fare clic sul pulsante centrale dei tre.

▶Selezionare una delle disposizioni predefinite, ad esempio «Standard».

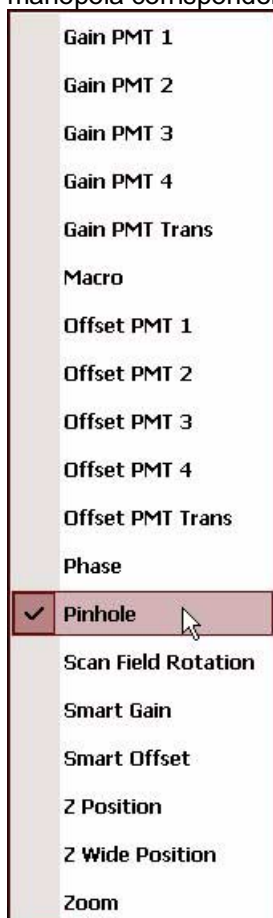
▶Nella barra di stato vengono mostrati in sette campi i parametri di ripresa associati alla console di comando. La disposizione di questi campi corrisponde alla disposizione delle manopole della console di comando.

3° passo

È possibile modificare la **disposizione** delle manopole della console di comando secondo le proprie necessità.

Gain PMT 1

▶Fare clic nella barra di stato della console di comando sul campo (manopola) a cui si desidera associare un altro parametro di ripresa.

▶Selezionare nel campo d'elenco il nuovo parametro di ripresa da associare alla

manopola corrispondente della console di comando.

▶Selezionare «Gain PMT 1..» (Guadagno PMT 1...) oppure «Offset PMT 1...» (Offset PMT 1...) nel caso si desideri impostare l'amplificazione segnale ed il valore di soglia per il rivelatore corrispondente. Corrisponde a questo tasto del software:

▶Selezionare «Phase» (Fase) per correggere un possibile sfasamento, quando si lavori con la scansione bidirezionale. Corrisponde a questo tasto del software:

▶Selezionare «Pinhole» (Foro stenopeico) nel caso si desideri impostare il diametro del diaframma di rilevamento a foro. Corrisponde a questo tasto del software:

▶Selezionare «Scan Field Rotation» (Rotazione campo di scansione) nel caso si desideri impostare la rotazione del campo di scansione. Corrisponde a questo tasto del software:

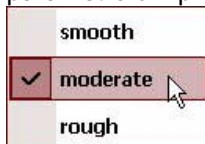
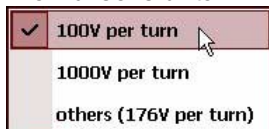
▶Selezionare «Z Position» (Posizione Z) e «Z Wide Position» (Posizione in ampiezza Z) nel caso si desideri impostare il piano focale (posizione Z). Corrisponde a questi tasti del software:

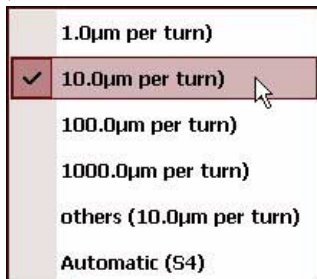
▶Selezionare «Zoom» nel caso si desideri impostare il fattore d'ingrandimento dello zoom elettronico. Corrisponde a questo tasto del software:

▶Con «Smart Gain» (Guadagno evoluto) e «Smart Offset» (Offset evoluto) vengono impostati l'amplificazione segnale e il valore di soglia del canale di rilevamento precedentemente selezionati con un clic nella finestra di visualizzazione Viewer.

▶Con «Macro» viene salvato come macro il comando attualmente eseguito.

4° passo

La **sensibilità di risposta** delle manopole può essere modificata: per fare questo, fare clic nella barra di stato della console di comando con il tasto destro del mouse su un parametro di ripresa.

▶Per i parametri di ripresa «Phase» (Fase), «Pinhole» (Foro stenopeico), «Scan Field Rotation» (Rotazione campo di scansione) e «Zoom» si possono selezionare tre diversi livelli di sensibilità.

▶Per i parametri di ripresa «Gain» (Guadagno), «Offset», «Smart Gain» (Guadagno evoluto) e « Smart Offset» (Offset evoluto), si può modificare il numero di volt per giro della manopola.

▶Selezionare «others...» (altri...) per inserire un valore definito dall'utente.

▶Per i parametri di ripresa «Z Position» (Posizione Z) e «Z Wide Position» (Posizione in ampiezza Z) si può modificare il numero di micrometri per giro della manopola.

▶Selezionare «others...» (altri...) per inserire un valore definito dall'utente.

▶Per il parametro di ripresa «Z Wide Position» vi è inoltre l'impostazione standard «Automatic».

Impostazione standard «Automatic» in «Z Wide Position»

Nell'impostazione standard «Automatic», la sensibilità della manopola viene impostata automaticamente in correlazione con il fattore d'ingrandimento dell'obiettivo utilizzato:

▶Per obiettivi con ingrandimento m < 10 viene utilizzata l'impostazione SC = 150 µ m per giro.

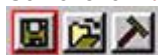
▶Per obiettivi con ingrandimento 10 < m < 20 viene utilizzata l'impostazione S3 = 15 µm per giro.

▶Per obiettivi con ingrandimento 20 < m < 30 viene utilizzata l'impostazione S2 = 7 µm per giro.

▶Per obiettivi con ingrandimento 30 < m < 60 viene utilizzata l'impostazione S1 = 1 µm per giro.

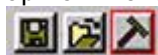
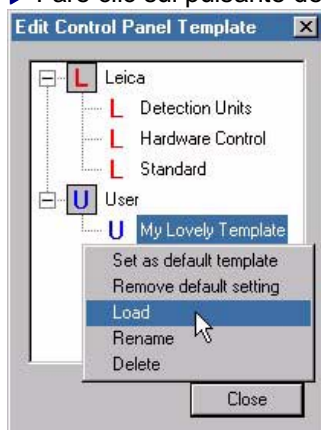
▶Per obiettivi con ingrandimento m > 60 viene utilizzata l'impostazione S0 = 0,5 µ m per giro.

5° passo

Salvare la **nuova correlazione** come disposizione definita dall'utente.

▶Fare clic sul pulsante sinistro dei tre.

▶Attribuire un nome alla disposizione e fare clic su OK.

6° passo

Per avere a disposizione comandi opzionali, evidenziare la **nuova disposizione** ed aprire il menu contestuale con il tasto destro del mouse.

▶Fare clic sul pulsante destro dei tre.

La nuova disposizione della console di comando appare nel campo d'elenco sotto «**U**». Sempre facendo doppio clic su «My Lovely Template» (Modello preferito), viene caricata la disposizione corrispondente.

▶Selezionare «Set as default template» (Imposta come modello predefinito) nel caso in cui la disposizione vada caricata come standard all'apertura del software.

▶Selezionare «Remove default setting» (Rimuovi impostazione predefinita) per annullare l'impostazione come disposizione standard.

▶Selezionare «Load» (Carica) per caricare la disposizione.

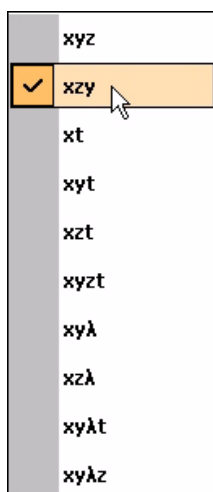
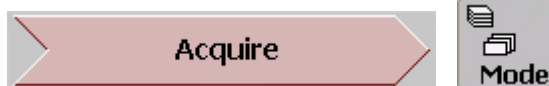
▶Selezionare «Rename» (Rinomina) per attribuire un nuovo nome alla disposizione.

▶Selezionare «Delete» (Cancella) per cancellare la disposizione.

{tc "Acquisire serie immagini spaziali"}

Acquisire serie immagini spaziali

1° passo

Fare clic sul simbolo a freccia «**Acquire**» (Acquisizione), quindi sul tasto «Mode» (Modalità) e selezionare la modalità scansione «xyz» o«xzy» .

▶Selezionare la modalità scansione «xyz» nel caso si desideri acquisire una pila di fotogrammi orizzontali (ortogonali all'asse ottico).

▶Selezionare la modalità scansione «xzy» nel caso si desideri acquisire una pila di fotogrammi verticali (paralleli all'asse ottico).

Quali modalità di scansione vengono mostrate?

Il numero delle modalità di scansione disponibili dipende dal tipo dell'attuatore Z utilizzato. L'attuatore Z viene impostato con il tasto «z-Scan» (Scansione z).

Nel caso in cui venga utilizzato il tavolo portaoggetti Z azionato a galvanometro, sono disponibili tutte le modalità di scansione. Nel campo d'elenco va impostata la selezione «z-Galvo».

Nel caso in cui venga utilizzato il tavolo portaoggetti Z a motore elettrico, o nel caso di microscopi inversi la torretta portaobiettivi venga traslata, sono disponibili solamente le modalità di scansione «xyz, xt, xyt, xyzt, xyλ, xyλt ed xyλz». Nel campo d'elenco va impostata la selezione «z-Wide».

2° passo

Aprire con il tasto «**Beam**» (Raggio) la finestra di dialogo «Beam Path Setting» (Impostazione percorso raggio), selezionare la lunghezza d'onda di eccitazione ed impostare l'intensità della traccia laser.

▶Trascinare il regolatore a scorrimento o fare doppio clic sul valore numerico ed immettere un valore d'intensità del laser.

 Avvertenza

Con un set di parametri predefinito è possibile attivare con un clic parametri di ripresa ottimizzati. A questo riguardo, leggere «Creare set di parametri di ripresa (IPS) generati dall'utente».

& vedi capitolo „Come creare set di parametri di ripresa (IPS) generati dall'utente“ (pagina 73)

3° passo

Selezionare un **divisore del fascio di eccitazione** appropriato.

Nel caso in cui il sistema sia equipaggiato con un divisore del fascio acusto-ottico (AOBS, Acousto-Optic Beam Splitter), esso ottimizza automaticamente il percorso del raggio alla lunghezza d'onda selezionata.
Altrimenti, fare doppio clic sulla riga verde e selezionare un divisore del fascio:

▶Selezionare la dicroite RSP 500 per acquisizioni di FITC e GFP di lunghezza d'onda di eccitazione di 488 nm ed ampiezza di banda di rilevamento da 500 a 600 nm.

▶Selezionare la dicroite RSP 465 per acquisizioni di CFP con lunghezza d'onda di eccitazione di 458 nm ed ampiezza di banda di rilevamento da 465 a 525 nm.

▶Selezionare la bi-dicroite DD 488 / 543 per acquisizioni di FITC e TRITC oppure GFP e DsRED con lunghezza d'onda di eccitazione di 488 e 543 nm ed ampiezza di banda di rilevamento da 500 a 530 nm, oppure da 555 a 700 nm.

▶Selezionare la tricroite TD 488 / 543 / 633 per acquisizioni di FITC, TRITC e CY5 con lunghezza d'onda di eccitazione di 488, 543 e 633 nm ed ampiezza di banda di rilevamento da 500 a 535 nm, da 555 a 620 nm o da 650 a 750 nm.

▶Selezionare il divisore neutro RT 30/70 per acquisizioni a riflessione.

4° passo

Selezionare uno o più **canali di rilevamento «PMT»** ed impostare il colorante fluorescente utilizzato e l'ampiezza di banda di rilevamento.

▶Fare clic sul campo d'elenco di un canale di rilevamento e selezionare un colorante fluorescente. La curva di emissione del colorante fluorescente viene visualizzata nello spettro.

▶Posizionare il regolatore a scorrimento al di sotto della curva di emissione.

Avvertenza sulla posizione della banda di rilevamento

Con riprese a fluorescenza, prestare attenzione a non posizionare la banda di rilevamento al di sotto della traccia laser, dato che in caso contrario la luce di riflessione viene anch'essa acquisita. La distanza della banda di rilevamento dalla traccia laser dev'essere nel campo spettrale blu (linea di eccitazione 488 nm) di almeno 5 nm, nel campo spettrale verde (linea di eccitazione 543 nm) di 10 nm e nel campo spettrale rosso (eccitazione 633 nm) di 15 nm. Se si utilizza l'AOBS, è ancora possibile diminuire la distanza dalla traccia laser, poiché questo divisore del fascio di eccitazione a luce riflessa dispone di una soppressione notevolmente migliore rispetto ai divisori del fascio convenzionali. Per fare questo è però necessario che l'indice di calcolo del campione e del mezzo tra vetrino e obiettivo sia ottimale.

▶Fare doppio clic sul regolatore a scorrimento del canale di rilevamento selezionato.

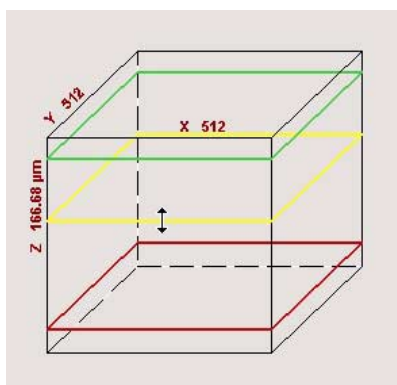
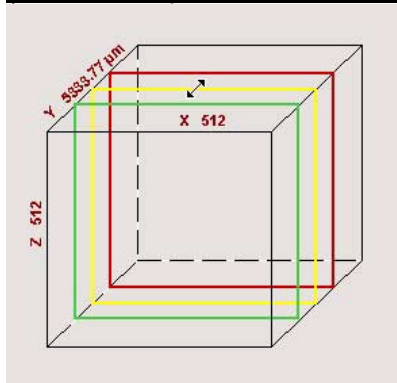
▶Nella finestra di dialogo «Range Properties» (Proprietà campo) inserire una lunghezza d'onda ciascuno per l'inizio e il termine della banda di rilevamento.

▶**Fare clic sul simbolo della tabella di classificazione cromatica.**

Fare clic su una tabella di classificazione cromatica. Per la prima acquisizione immagini si raccomanda di lavorare con la tabella di classificazione cromatica «Glow(OU)».

& vedi capitolo „Impostare i parametri di ripresa per la prima acquisizione immagini" (pagina 65)

5° passo

Aprire con il tasto «**Series**» (Serie) la finestra di dialogo «Series Scan Overview» (Panoramica scansione in serie) e definire il punto iniziale e il punto finale delle serie d'immagini spaziale.

<u>Modalità scansione xyz</u>
<u>(Mantenere il puntatore del mouse sull'immagine)</u>

Modalità scansione xzy

▶Per definire il punto iniziale, trascinare il quadratino giallo sulla posizione Z (in modalità scansione xyz) o Y (in modalità scansione xzy) desiderata e fare quindi clic sulla casella di spunta «Begin» (Inizia).

▶Per definire il punto finale, trascinare il quadratino giallo sulla posizione Z (in modalità scansione xyz) o Y (in modalità scansione xzy) desiderata e fare quindi clic sulla casella di spunta «End» (Termina).

oppure

Selected Scan Mode: xzy

Absolute Position -44.94 µm
Relative Position: -
Begin: 999.67 µm
End: -999.67 µm
Total: 1999.35 µm
Upper Threshold: -
Lower Threshold: -

▶Fare doppio clic su «Absolute Position» (Posizione assoluta), inserire un valore e fare quindi clic sulla casella di spunta «Begin» (Inizia).

▶Fare doppio clic su «Absolute Position», inserire un valore e fare quindi clic sulla casella di spunta «End» (Termina).

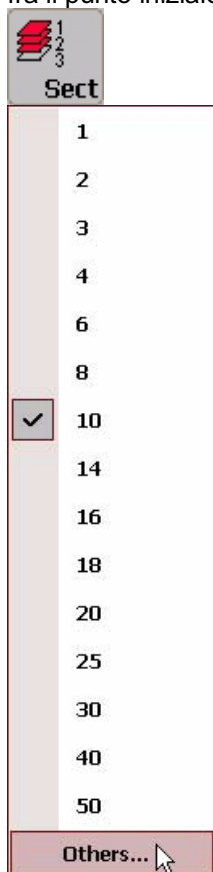
Diversi parametri di ripresa possono essere impostati più rapidamente e con maggiore comodità tramite la console di comando piuttosto che con i tasti.

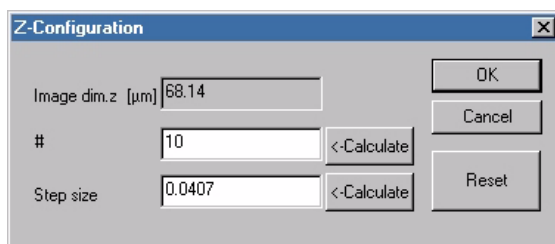
& vedi capitolo „Come impostare i parametri di ripresa tramite la console di comando“ (pagina 79)

Posizionamento Z relativo

Quando viene utilizzato l'attuatore Z a motore elettrico ed è stata impostata con il tasto «z-Scan» (Scansione z) l'opzione «z-Wide» (z estesa), è possibile impostare una posizione Z relativa. La posizione Z relativa viene calcolata in relazione al valore di soglia superiore «Upper Threshold» (Soglia superiore) che va impostato sullo stativo del microscopio. Detta possibilità di posizionamento Z relativo esiste solamente per stativi per microscopio dei tipi DM RXA, DM RXA2, DM IRE2 e DM LFSA (così come per gli stativi precedenti IRBE con versione EPROM 2.40). I due valori di soglia «Upper Threshold» (Soglia superiore) e «Lower Threshold» (Soglia inferiore) vengono mostrati nella finestra di dialogo «Series Overview» (Panoramica serie).

6° passo

Fare clic sul tasto «**Sections**» (Sezioni) e stabilire il numero delle acquisizioni immagini fra il punto iniziale e quello finale.

▶Selezionare uno dei valori predefiniti, oppure «Others» (Altri).

Nel caso si selezioni «Others», nella finestra di dialogo «**Z/Y-Configuration**» (Configurazione Z/Y) si ha la possibilità di calcolare il numero di riprese «#» oppure l'ampiezza d'intervallo «Step size» (Ampiezza intervallo) in relazione all'altezza della pila d'immagini «Image dim.z» (Dim. immagine z).

▶Nel caso si modifichi il numero delle riprese e si faccia clic su «Calculate» (Calcola) accanto a «#», l'ampiezza d'intervallo viene calcolata con la priorità di lasciare invariata l'altezza della pila d'immagini.

▶Nel caso si modifichi il numero delle riprese e si faccia clic su «Calculate» accanto a «Step size» (Ampiezza intervallo), l'ampiezza d'intervallo viene calcolata con la priorità di lasciare invariato il numero delle acquisizioni.

▶Nel caso si modifichi l'ampiezza d'intervallo e si faccia clic su «Calculate» accanto a «Step size», il numero delle riprese viene calcolato con la priorità di lasciare invariata l'altezza della pila d'immagini.

▶Nel caso si modifichi l'ampiezza d'intervallo e si faccia clic su «Calculate» accanto a «#», il numero delle riprese viene calcolato con la priorità di lasciare invariata l'ampiezza d'intervallo.

7° passo

Per ottimizzare la qualità dell'immagine durante l'acquisizione dell'immagine stessa, avviare con il tasto «**Continuous**» (Continua) l'acquisizione immagini in scansione continua.

▶Impostare il piano focale (posizione Z), i rivelatori ed il foro stenopeico di rilevamento. Per questa operazione, leggere i passi da 7 a 15 nel capitolo "Impostare i parametri di ripresa per la prima acquisizione immagini" (pagina 66)».

& vedi capitolo „Impostare i parametri di ripresa per la prima acquisizione immagini“ (pagina 65)

8° passo

Avviare con il tasto «**Series**» (Serie) la serie d'immagini spaziale.

▶Per migliorare il rapporto segnale/rumore, fare clic sul tasto «Average» (Media). Stabilire con quale frequenza vada ripetuta l'acquisizione di un'immagine. Viene indicato di volta in volta il valore medio.

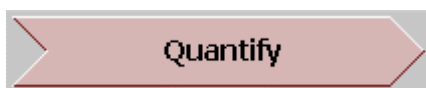
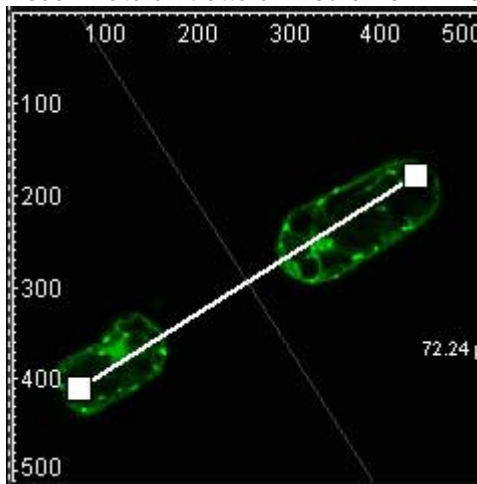
▶Per migliorare il rapporto segnale/rumore, fare clic sul tasto «Line Average» (Media riga). Stabilire con quale frequenza vada ripetuta l'acquisizione di una riga. Viene indicato di volta in volta il valore medio.

▶Fare clic sul tasto «Gallery» (Galleria) per visualizzare già durante l'acquisizione immagini le singole riprese nella finestra di visualizzazione Viewer (Visualizzatore).

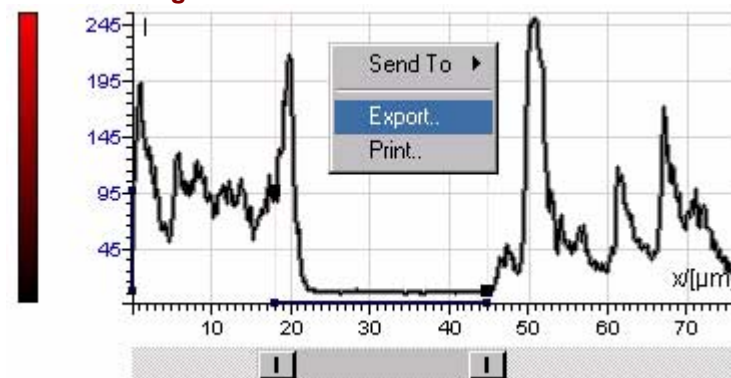
Attenzione

In caso di acquisizione di set di dati di grandi dimensioni, l'utilizzo della funzione «Gallery» potrebbe inficiare la potenza di ripresa.

9° passo

Per un'analisi statistica della serie d'immagini spaziale, fare clic sul simbolo a freccia «**Quantify**» (Quantificazione), e quindi ad esempio sul tasto «Profile» (Profilo).

Azionando questo tasto si apre la finestra di dialogo «Profile» (Profilo) e viene visualizzato un tratto di misura nell'immagine.

▶Il tratto di misura può essere riposizionato a piacimento.

10° passo

I seguenti comandi sono disponibili nella finestra di dialogo «Profile», in cui viene visualizzato il **grafo di analisi** insieme con diversi valori statistici.

▶Mantenere il puntatore del mouse sul diagramma ed aprire il menu contestuale azionando il tasto destro del mouse.

▶Selezionare «Export» (Esporta) per esportare i dati di analisi come file di testo ASCII.

▶Selezionare «Send to» (Invia a) e «Document» (Documento) per creare una copia della schermata del grafo di analisi come nuovo file nell'esperimento attivo.

▶Selezionare «Print» (Stampa) per stampare il grafo di analisi.

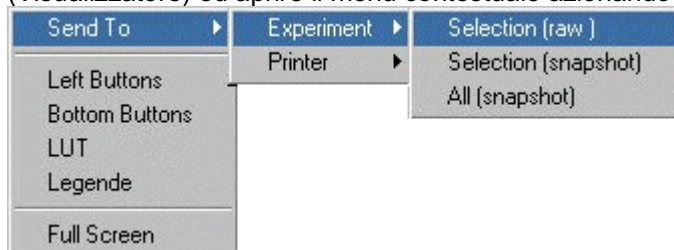
▶Fare clic sul simbolo a freccia «View» (Visualizza) e sul tasto «Play» per far scorrere la serie d'immagini spaziale come filmato. Simultaneamente a ciò vengono visualizzati il

grafo di analisi ed i relativi dati di analisi dei fotogrammi corrispondenti.

11° passo

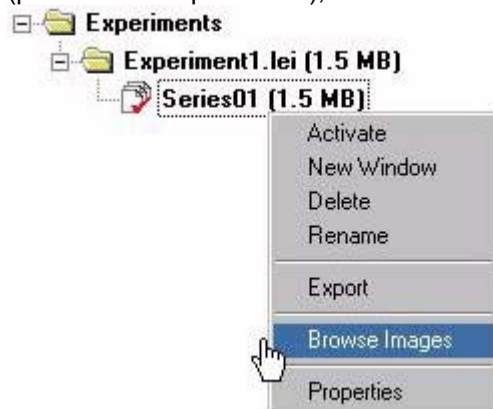
È possibile collocare nell'esperimento attivo un'**immagine di un canale di rilevamento** o un'immagine in sovrapposizione proveniente da più canali di rilevamento separatamente, come nuovo set di dati.

▶Fare clic sull'immagine del canale di rilevamento desiderato, o sull'immagine in sovrapposizione.

▶Mantenere il puntatore del mouse sulla finestra di visualizzazione Viewer (Visualizzatore) ed aprire il menu contestuale azionando il tasto destro del mouse.

▶Selezionare «Selection (raw)» per disporre i dati immagine del particolare evidenziato come nuovo file.

▶Selezionare «Selection (snapshot)» per creare una copia della schermata del particolare evidenziato come nuovo file.

▶Selezionare «All (snapshot)» per creare una copia della schermata dell'immagine intera come nuovo file.

I file salvati si trovano nella finestra di visualizzazione «Experiment Overview» (panoramica esperimento), nel cui menu contestuale sono disponibili i seguenti comandi:

▶Evidenziare un file ed aprire il menu contestuale azionando il tasto destro del mouse.

▶Selezionare «Activate» per visualizzare i dati immagine del file nella finestra di visualizzazione Viewer.

▶Selezionare «New Window» (Nuova finestra) per aprire la ripresa attuale in una seconda finestra di visualizzazione. In questo modo è possibile visualizzare la stessa immagine ad esempio con un'altra tabella di classificazione cromatica.

▶Selezionare «Delete» (Cancella) per cancellare il file.

▶Selezionare «Rename» (Rinomina) per attribuire al file un nuovo nome.

▶Selezionare «Export» per esportare una ripresa nel formato file *.avi.

▶Selezionare «Browse Images» (Sfoglia immagini) per visualizzare tutte le riprese di un esperimento come immagini miniaturizzate sull'interfaccia operatore.

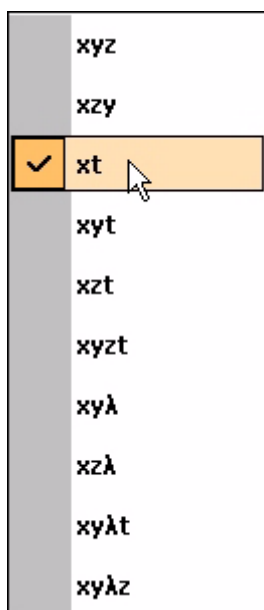
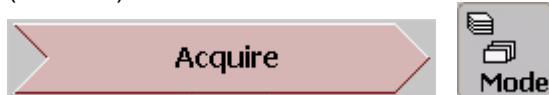
▶Selezionare «Properties» (Proprietà) per inserire una didascalia della ripresa in una finestra di dialogo.

▶È possibile trascinare e spostare file da un esperimento ad un altro (drag and drop = trascina e rilascia) trascinando il file, tenendo premuto il tasto sinistro del mouse, sulla cartella dell'esperimento desiderato.

{tc "Acquisire serie immagini temporali"}

Acquisire serie immagini temporali

1° passo

Fare clic sul simbolo a freccia «**Acquire**» (Acquisizione), quindi sul tasto «Mode» (Modalità) e selezionare le modalità scansione «xt», «xyt», «xzt» o «xyzt».

▶Selezionare la modalità scansione «xt» nel caso si desideri acquisire una riga ad intervalli di tempo regolari.

▶Selezionare la modalità scansione «xyt» nel caso si desideri acquisire fotogrammi orizzontali (ortogonali all'asse ottico) ad intervalli di tempo regolari.

▶Selezionare la modalità scansione «xzt» nel caso si desideri acquisire fotogrammi verticali (paralleli all'asse ottico) ad intervalli di tempo regolari.

▶Selezionare la modalità scansione «xyzt» nel caso si desideri acquisire una pila di fotogrammi orizzontali (ortogonali all'asse ottico) ad intervalli di tempo regolari.

La selezione di una di queste modalità scansione attiva automaticamente il tasto «Time» (Temporizzazione), necessario per l'acquisizione di una serie immagini temporale:

Quali modalità di scansione vengono mostrate?

Il numero delle modalità di scansione disponibili dipende dal tipo dell'attuatore Z utilizzato. L'attuatore Z viene impostato con il tasto «z-Scan» (Scansione z).

Nel caso in cui venga utilizzato il tavolo portaoggetti Z azionato a galvanometro, sono disponibili tutte le modalità di scansione. Nel campo d'elenco va impostata la selezione «z-Galvo».
Nel caso in cui venga utilizzato il tavolo portaoggetti Z a motore elettrico, o nel caso di microscopi inversi la torretta portaobiettivi venga traslata, sono disponibili solamente le modalità di scansione «xyz, xt, xyt, xyzt, xyλ, xyλt ed xyλz». Nel campo d'elenco va impostata la selezione «z-Wide».

2° passo

Aprire con il tasto «**Beam**» (Raggio) la finestra di dialogo «Beam Path Setting» (Impostazione percorso raggio), selezionare la lunghezza d'onda di eccitazione ed impostare l'intensità della traccia laser.

▶Trascinare il regolatore a scorrimento o fare doppio clic sul valore numerico ed immettere un valore d'intensità del laser.

Avvertenza

Con un set di parametri predefinito è possibile attivare con un clic parametri di ripresa ottimizzati. A questo riguardo, leggere «Creare set di parametri di ripresa (IPS) generati dall'utente».

& vedi capitolo „Come creare set di parametri di ripresa (IPS) generati dall'utente" (pagina 73)

3° passo

Selezionare un **divisore del fascio di eccitazione** appropriato.

Nel caso in cui il sistema sia equipaggiato con un divisore del fascio acusto-ottico (AOBS, Acousto-Optic Beam Splitter), esso ottimizza automaticamente il percorso del raggio alla lunghezza d'onda selezionata.
Altrimenti, fare doppio clic sulla riga verde e selezionare un divisore del fascio:

▶Selezionare la dicroite RSP 500 per acquisizioni di FITC e GFP di lunghezza d'onda di eccitazione di 488 nm ed ampiezza di banda di rilevamento da 500 a 600 nm.

▶Selezionare la dicroite RSP 465 per acquisizioni di CFP con lunghezza d'onda di

eccitazione di 458 nm ed ampiezza di banda di rilevamento da 465 a 525 nm.

▶Selezionare la bi-dicroite DD 488 / 543 per acquisizioni di FITC e TRITC oppure GFP e DsRED con lunghezza d'onda di eccitazione di 488 e 543 nm ed ampiezza di banda di rilevamento da 500 a 530 nm, oppure da 555 a 700 nm.

▶Selezionare la tricroite TD 488 / 543 / 633 per acquisizioni di FITC, TRITC e CY5 con lunghezza d'onda di eccitazione di 488, 543 e 633 nm ed ampiezza di banda di rilevamento da 500 a 535 nm, da 555 a 620 nm o da 650 a 750 nm.

▶Selezionare il divisore neutro RT 30/70 per acquisizioni a riflessione.

4° passo

Selezionare uno o più **canali di rilevamento «PMT»** ed impostare il colorante fluorescente utilizzato e l'ampiezza di banda di rilevamento.

▶Fare clic sul campo d'elenco di un canale di rilevamento e selezionare un colorante fluorescente. La curva di emissione del colorante fluorescente viene visualizzata nello spettro.

▶Posizionare il regolatore a scorrimento al di sotto della curva di emissione.

Avvertenza sulla posizione della banda di rilevamento

Con riprese a fluorescenza, prestare attenzione a non posizionare la banda di rilevamento al di sotto della traccia laser, dato che in caso contrario la luce di riflessione viene anch'essa acquisita. La distanza della banda di rilevamento dalla traccia laser dev'essere nel campo spettrale blu (linea di eccitazione 488 nm) di almeno 5 nm, nel campo spettrale verde (linea di eccitazione 543 nm) di 10 nm e nel campo spettrale rosso (eccitazione 633 nm) di 15 nm. Se si utilizza l'AOBS, è ancora possibile diminuire la distanza dalla traccia laser, poiché questo divisore del fascio di eccitazione a luce riflessa dispone di una soppressione notevolmente migliore rispetto ai divisori del fascio convenzionali. Per fare questo è però necessario che l'indice di calcolo del campione e del mezzo tra vetrino e obiettivo sia ottimale.

▶Fare doppio clic sul regolatore a scorrimento del canale di rilevamento selezionato.

▶Nella finestra di dialogo «Range Properties» (Proprietà campo) inserire una lunghezza d'onda ciascuno per l'inizio e il termine della banda di rilevamento.

▶Fare clic sul simbolo della tabella di classificazione cromatica.

▶Fare clic su una tabella di classificazione cromatica. Per la prima acquisizione immagini si raccomanda di lavorare con la tabella di classificazione cromatica «Glow(OU)».

& vedi capitolo „Impostare i parametri di ripresa per la prima acquisizione immagini" (pagina 65)

5° passo

Fare clic sul tasto «**Time**» (Temporizzazione) ed impostare i parametri necessari per la serie immagini temporale.

I parametri impostabili differiscono per le varie modalità di scansione di una serie immagini temporale.

Modalità di funzionamento finestra di dialogo «Time Configuration»

Ciascun parametro può essere calcolato in base agli altri parametri. Fare clic sul parametro da calcolare. Il relativo campo d'inserimento appare grigio. A questo punto, immettere i valori relativi agli altri parametri. Fare clic su «Apply» (applica) per calcolare il parametro. Fare clic su «Reset» (reimposta) per visualizzare gli ultimi valori salvati.

Nel caso sia selezionata la modalità scansione «xt», occorre impostare questi parametri:

▶Nel campo «Lines» (Righe) inserire il numero di riprese della riga.

☑ Maximize (default)

▶Disattivare la casella di spunta «Maximize» (Massimizzazione) per impostare nel campo «Lines per page» (Righe per pagina) il numero di righe da acquisire prima che i dati vengano trasmessi al calcolatore. Nell'impostazione standard, una ripresa viene eseguita di continuo fino a quando la memoria della testina di scansione non può più acquisire dati.

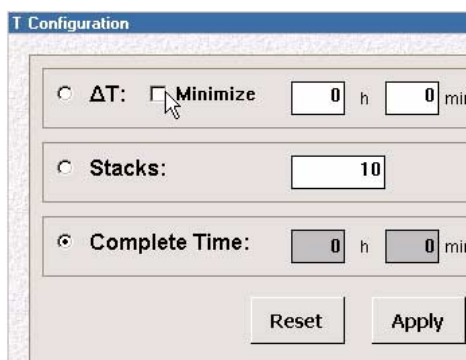
▶Nel campo «Complete Time» (Tempo complessivo) inserire il tempo complessivo dell'acquisizione immagini.

Nel caso siano selezionate le modalità scansione «xyt» o «xzt», occorre impostare questi parametri:

▶Nel campo «Frames» (Fotogrammi) inserire il numero di riprese del fotogramma.

▶Nel campo «ΔT» definire l'intervallo temporale fra le riprese di due fotogrammi. Nel caso sia selezionata la casella di spunta «Minimize» (Minimizzazione), viene impostato l'intervallo minimo, vale a dire il tempo di ripresa di un fotogramma (correlato a parametri di scansione quali il formato di scansione e la velocità di scansione) più un intervallo di pausa necessario per il posizionamento dello specchio di scansione.

▶Nel campo «Complete Time» (Tempo complessivo) inserire il tempo complessivo dell'acquisizione immagini.

Nel caso sia selezionata la modalità scansione «xyzt», occorre impostare i seguenti parametri:

▶Nel campo «Stacks» (Pile) inserire il numero di riprese della pila d'immagini.

▶Nel campo «ΔT» definire l'intervallo temporale fra le riprese di due pile d'immagini. Nel caso sia selezionata la casella di spunta «Minimize» (Minimizzazione), viene impostato l'intervallo minimo, vale a dire il tempo di ripresa di una pila d'immagini (correlato a parametri di scansione quali il formato di scansione e la velocità di scansione) più un intervallo di pausa necessario per il posizionamento dello specchio di scansione.

▶Nel campo «Complete Time» (Tempo complessivo) inserire il tempo complessivo dell'acquisizione immagini.

6° passo

Per ottimizzare la qualità dell'immagine durante l'acquisizione dell'immagine stessa, avviare con il tasto «**Continuous**» (Continua) l'acquisizione immagini in scansione continua.

▶Impostare il piano focale (posizione Z), i rivelatori ed il foro stenopeico di rilevamento. Per questa operazione, leggere i passi da 7 a 15 nel capitolo «Impostare i parametri di ripresa per la prima acquisizione immagini».

& vedi capitolo «Impostare i parametri di ripresa per la prima acquisizione immagini» (pagina 65)

7° passo

Avviare con il tasto «**Series**» (Serie) la serie d'immagini temporale.

▶Per migliorare il rapporto segnale/rumore, fare clic sul tasto «Average» (Media). Stabilire con quale frequenza vada ripetuta l'acquisizione di un'immagine. Viene indicato di volta in volta il valore medio.

▶Per migliorare il rapporto segnale/rumore, fare clic sul tasto «Line Average» (Media riga). Stabilire con quale frequenza vada ripetuta l'acquisizione di una riga. Viene indicato di volta in volta il valore medio.

8° passo

Per un'analisi statistica della serie d'immagini temporale, fare clic sul simbolo a freccia « **Quantify**» (Quantificazione), e quindi ad esempio sul tasto «Histogram» (Istogramma).

Azionando questo tasto si apre la finestra di dialogo «Histogram», e vengono attivati automaticamente i tasti ROI, necessari nei passi successivi:

9° passo

Evidenziare un campo di analisi (ROI) nell'immagine facendo clic ad esempio sul tasto «**Wizard**» (Procedura guidata) e sul tasto «Polygon» (Poligono).

▶Fare doppio clic nell'immagine sulla struttura da analizzare. I contorni della struttura vengono automaticamente evidenziati come campo di analisi.

▶Selezionare con i tasti «Ellipse» (Ellisse) o «Rectangle» (Rettangolo) altre forme geometriche ed evidenziare ulteriori campi di analisi nell'immagine.

▶Disattivare il tasto «Wizard» nel caso si desideri tracciare a mano i campi di analisi nell'immagine.

▶Con i tasti «Select» (Seleziona) e «Rotate» (Ruota) è possibile spostare o ruotare i campi di analisi e variarne le dimensioni; con il tasto «Clear» (Cancella) è possibile cancellare tutti i campi di analisi.

10° passo

I seguenti comandi sono disponibili nella finestra di dialogo «Histogram» (Istogramma), in cui viene visualizzato il **grafo di analisi** insieme con diversi valori statistici.

▶Mantenere il puntatore del mouse sul diagramma ed aprire il menu contestuale azionando il tasto destro del mouse.

▶Selezionare «Export» (Esporta) per esportare i dati di analisi come file di testo ASCII.

▶Selezionare «Send to» (Invia a) e «Document» (Documento) per creare una copia della schermata del grafo di analisi come nuovo file nell'esperimento attivo.

▶Selezionare «Print» (Stampa) per stampare il grafo di analisi.

▶Fare clic sul simbolo a freccia «View» (Visualizzazione) e sul tasto «Play» per far scorrere la serie d'immagini temporale come filmato. Simultaneamente a ciò vengono visualizzati il grafo di analisi ed i relativi dati di analisi dei fotogrammi corrispondenti.

11° passo

È possibile collocare nell'esperimento attivo un'**immagine di un canale di rilevamento** o un'immagine in sovrapposizione proveniente da più canali di rilevamento separatamente, come nuovo set di dati.

▶Fare clic sull'immagine del canale di rilevamento desiderato, o sull'immagine in sovrapposizione.

▶Mantenere il puntatore del mouse sulla finestra di visualizzazione Viewer (Visualizzatore) ed aprire il menu contestuale azionando il tasto destro del mouse.

▶Selezionare «Selection (raw)» (Selezione/grezzi) per disporre i dati immagine del particolare evidenziato come nuovo file.

▶Selezionare «Selection (snapshot)» (Selezione/istantanea) per creare una copia della schermata del particolare evidenziato come nuovo file.

▶Selezionare «All (snapshot)» (Tutto/istantanea) per creare una copia della schermata dell'immagine intera come nuovo file.

I file salvati si trovano nella finestra di visualizzazione «Experiment Overview» (panoramica esperimento), nel cui menu contestuale sono disponibili i seguenti comandi:

▶Evidenziare un file ed aprire il menu contestuale azionando il tasto destro del mouse.

▶Selezionare «Activate» (Attiva) per visualizzare i dati immagine del file nella finestra di visualizzazione Viewer.

▶Selezionare «New Window» (Nuova finestra) per aprire la ripresa attuale in una seconda finestra di visualizzazione. In questo modo è possibile visualizzare la stessa immagine ad esempio con un'altra tabella di classificazione cromatica.

▶Selezionare «Delete» (Cancella) per cancellare il file.

▶Selezionare «Rename» (Rinomina) per attribuire al file un nuovo nome.

▶Selezionare «Export» (Esporta) per esportare una ripresa nel formato file *.avi.

▶Selezionare «Browse Images» (Sfoglia immagini) per visualizzare tutte le riprese di un esperimento come immagini miniaturizzate sull'interfaccia operatore.

▶Selezionare «Properties» (Proprietà) per inserire una didascalia della ripresa in una finestra di dialogo.

▶È possibile trascinare e spostare file da un esperimento ad un altro (drag and drop = trascina e rilascia) trascinando il file, tenendo premuto il tasto sinistro del mouse, sulla cartella dell'esperimento desiderato.

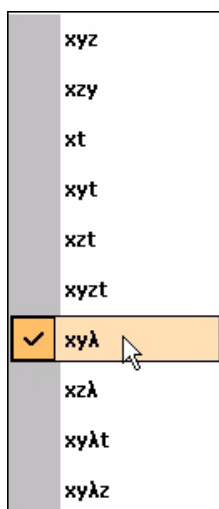
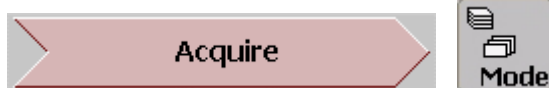
{tc "Acquisire serie lambda (serie immagini spettrali)"}

Acquisire serie lambda (serie immagini spettrali)

1° passo

Fare clic sul simbolo a freccia «**Acquire**» (Acquisizione) e sul tasto «Mode» (Modalità) e selezionare la modalità scansione «xyλ», «xzλ» «xyλt» o «xyλz».

Acquire

Mode

▶Selezionare la modalità scansione «xyλ» nel caso si desideri acquisire fotogrammi orizzontali (ortogonali all'asse ottico) ciascuno per una data lunghezza d'onda.

▶Selezionare la modalità scansione «xzλ» nel caso si desideri acquisire fotogrammi verticali (paralleli all'asse ottico) ciascuno per una data lunghezza d'onda.

▶Selezionare la modalità scansione «xyλt» se si desidera riprendere ripetutamente serie di immagini spettrali temporali, quindi fotogrammi orizzontali (ortogonali all'asse ottico), ciascuna ad una determinata lunghezza d'onda e ad intervalli temporali definibili.

▶Selezionare la modalità scansione «xyλz» se si desidera riprendere serie di immagini spettrali spaziali, quindi una pila di fotogrammi orizzontali (ortogonali all'asse ottico), ciascuna ad una determinata lunghezza d'onda.

La selezione di una delle modalità scansione attiva automaticamente i tasti necessari per la ripresa di una serie lambda:

Quali modalità di scansione vengono mostrate?

Il numero delle modalità di scansione disponibili dipende dal tipo dell'attuatore Z utilizzato. L'attuatore Z viene impostato con il tasto «z-Scan» (Scansione z).

Nel caso in cui venga utilizzato il tavolo portaoggetti Z azionato a galvanometro, sono disponibili tutte le modalità di scansione. Nel campo d'elenco va impostata la selezione «z-Galvo».
Nel caso in cui venga utilizzato il tavolo portaoggetti Z a motore elettrico, o nel caso di microscopi inversi la torretta portaobiettivi venga traslata, sono disponibili solamente le modalità di scansione «xyz, xt, xyt, xyzt, xyλ, xyλt ed xyλz». Nel campo d'elenco va impostata la selezione «z-Wide».
Le modalità scansione sono disponibili per la ripresa di una serie lambda solamente quando un solo canale di rilevamento è attivo.

2° passo

Aprire con il tasto «**Beam**» (Raggio) la finestra di dialogo «Beam Path Setting» (Impostazione percorso raggio), selezionare la lunghezza d'onda di eccitazione ed impostare l'intensità della traccia laser.

▶Trascinare il regolatore a scorrimento o fare doppio clic sul valore numerico ed immettere un valore d'intensità del laser.

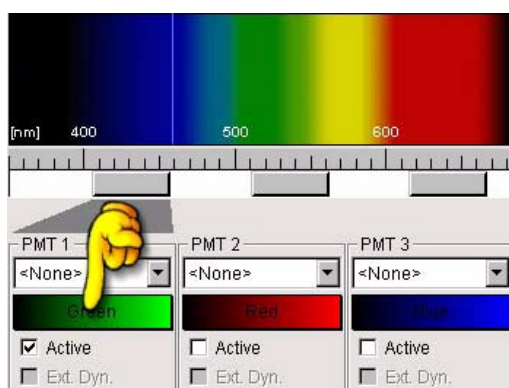
Avvertenza
Con un set di parametri predefinito è possibile attivare con un clic parametri di ripresa ottimizzati. A questo riguardo, leggere «Creare set di parametri di ripresa (IPS) generati dall'utente».
& vedi capitolo «Come creare set di parametri di ripresa (IPS) generati dall'utente» (pagina 73)

3° passo

Selezionare un **divisore del fascio di eccitazione** appropriato.

Nel caso in cui il sistema sia equipaggiato con un divisore del fascio acusto-ottico (AOBS, Acousto-Optic Beam Splitter), esso ottimizza automaticamente il percorso del raggio alla lunghezza d'onda selezionata.
In caso contrario, fare doppio clic sulla riga verde e selezionare il filtro neutro «RT 30/70», particolarmente appropriato per una serie lambda.

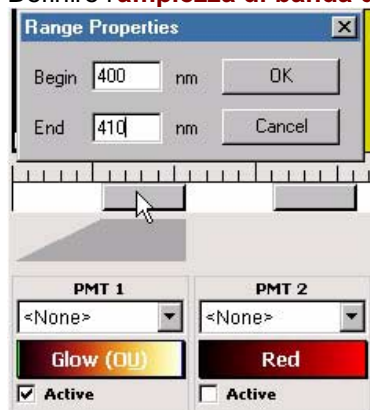
4° passo

Selezionare un **canale di rilevamento «PMT»** ed associare ad esso una tabella di classificazione cromatica.

▶Fare clic sul simbolo della tabella di classificazione cromatica.

▶Fare clic su una tabella di classificazione cromatica. Per la prima acquisizione immagini si raccomanda di lavorare con la tabella di classificazione cromatica «Glow(OU)».

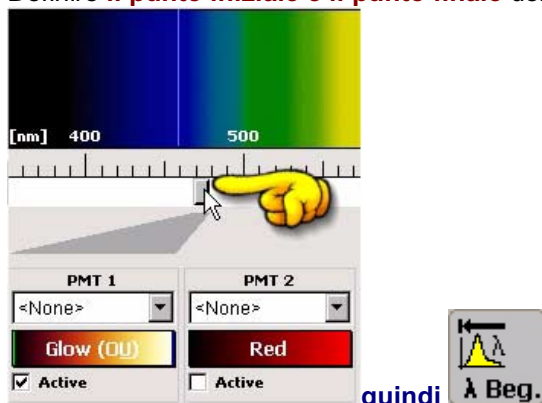
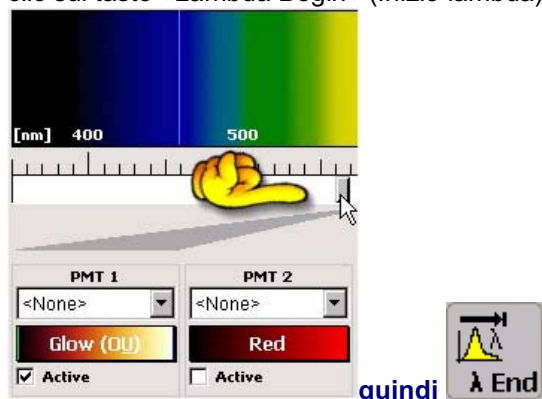
& vedi capitolo «Impostare i parametri di ripresa per la prima acquisizione immagini» (pagina 65)

5° passo

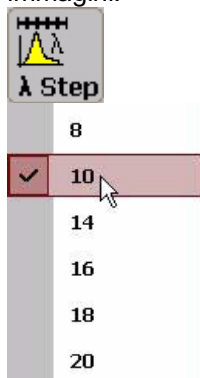
Definire l'**ampiezza di banda di rilevamento** per il canale di rilevamento utilizzato.

▶Fare doppio clic sul regolatore a scorrimento del canale di rilevamento selezionato.

▶Nella finestra di dialogo «Range Properties» (Proprietà campo) inserire una lunghezza d'onda ciascuno per l'inizio e il termine della banda di rilevamento. L'ampiezza minima possibile della banda di rilevamento è di 5nm.

6° passo

Definire **il punto iniziale e il punto finale** della serie lambda.

▶Trascinare il regolatore a scorrimento sulla posizione desiderata nello spettro e fare clic sul tasto «Lambda Begin» (Inizio lambda) per salvare il punto iniziale.

▶Trascinare il regolatore a scorrimento sulla posizione desiderata nello spettro e fare clic sul tasto «Lambda End» (Fine lambda) per salvare il punto finale.

7° passo

Fare clic sul tasto «**Lambda Steps**» (Intervalli lambda) e stabilire il numero delle riprese immagini.

All'interno del margine fra punto iniziale e finale della serie immagini, il numero di riprese impostato viene acquisito in ampiezze d'intervallo uniformi.

8° passo

Per ottimizzare la qualità dell'immagine durante l'acquisizione dell'immagine stessa, avviare con il tasto «**Continuous**» (Continua) l'acquisizione immagini in scansione continua.

▶Impostare il piano focale (posizione Z), i rivelatori ed il foro stenopeico di rilevamento in diverse posizioni dello spettro. Per questa operazione, leggere i passi da 7 a 15 nel capitolo «Impostare i parametri di ripresa per la prima acquisizione immagini».

& vedi capitolo «Impostare i parametri di ripresa per la prima acquisizione immagini» (pagina 65)

▶Se vengono selezionate le modalità scansione «xyλt» o «xyλz», occorre impostare ulteriori parametri per la serie di immagini temporale o spaziale. A questo riguardo, leggere i capitoli «Acquisire serie immagini spaziali» e «Acquisire serie immagini temporali».

& vedi capitolo «Acquisire serie immagini spaziali» (pagina 83) e capitolo «Acquisire serie immagini temporali» (pagina 93)

9° passo

Avviare con il tasto «**Series**» (Serie) la serie lambda.

▶Per migliorare il rapporto segnale/rumore, fare clic sul tasto «Average» (Media). Stabilire con quale frequenza vada ripetuta l'acquisizione di un'immagine. Viene indicato di volta in volta il valore medio.

▶Per migliorare il rapporto segnale/rumore, fare clic sul tasto «Line Average» (Media riga). Stabilire con quale frequenza vada ripetuta l'acquisizione di una riga. Viene indicato di volta in volta il valore medio.

▶Fare clic sul tasto «Gallery» (Galleria) per visualizzare già durante l'acquisizione immagini le singole riprese nella finestra di visualizzazione Viewer (Visualizzatore).

Attenzione

In caso di acquisizione di set di dati di grandi dimensioni, l'utilizzo della funzione «Gallery» potrebbe inficiare la potenza di ripresa.

10° passo

Per un'analisi statistica della serie lambda, fare clic sul simbolo a freccia «**Quantify**» (Quantificazione), e quindi ad esempio sul tasto «Pr.(z)».

Azionando questo tasto si apre la finestra di dialogo «Profile through Stack» (Profilo attraverso pila) e vengono attivati automaticamente i tasti ROI, necessari nei passi successivi:

11° passo

Evidenziare un campo di analisi (ROI) nell'immagine facendo clic ad esempio sul tasto «**Wizard**» (Procedura guidata) e sul tasto «Polygon» (Poligono).

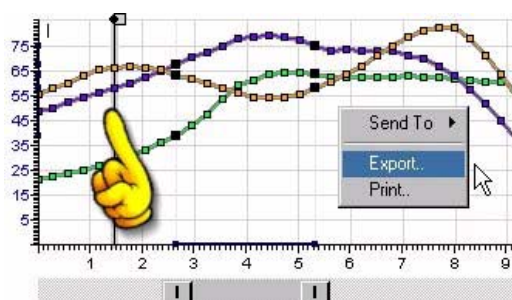
▶Fare doppio clic nell'immagine sulla struttura da analizzare. I contorni della struttura vengono automaticamente evidenziati come campo di analisi.

▶Selezionare con i tasti «Ellipse» (Ellisse) o «Rectangle» (Rettangolo) altre forme geometriche ed evidenziare ulteriori campi di analisi nell'immagine.

▶Disattivare il tasto «Wizard» nel caso si desideri tracciare a mano i campi di analisi nell'immagine.

▶Con i tasti «Select» e «Rotate» è possibile spostare o ruotare i campi di analisi e variarne le dimensioni; con il tasto «Clear» è possibile cancellare tutti i campi di analisi.

12° passo

I seguenti comandi sono disponibili nella finestra di dialogo «Profile through Stack» (Profilo attraverso pila), in cui viene visualizzato il **grafo di analisi** insieme con diversi valori statistici.

▶Mantenere il puntatore del mouse sul diagramma ed aprire il menu contestuale azionando il tasto destro del mouse.

▶Selezionare «Export» (Esporta) per esportare i dati di analisi come file di testo ASCII.

▶Selezionare «Send to» (Invia a) e «Document» (Documento) per creare una copia della schermata del grafo di analisi come nuovo file nell'esperimento attivo.

▶Selezionare «Print» (Stampa) per stampare il grafo di analisi.

▶Fare clic sul simbolo a freccia «View» (Visualizzazione) e sul tasto «Play» per far scorrere la serie lambda come filmato. Simultaneamente a ciò, vengono visualizzati tramite una riga di guida verticale il grafo di analisi ed i relativi dati di analisi dei rispettivi fotogrammi.

12° passo

È possibile collocare nell'esperimento attivo un'**immagine di un canale di rilevamento** o un'immagine in sovrapposizione proveniente da più canali di rilevamento separatamente, come nuovo set di dati.

▶Fare clic sull'immagine del canale di rilevamento desiderato, o sull'immagine in sovrapposizione.

▶Mantenere il puntatore del mouse sulla finestra di visualizzazione Viewer (Visualizzatore) ed aprire il menu contestuale azionando il tasto destro del mouse.

▶Selezionare «Selection (raw)» (Selezione/grezzi) per disporre i dati immagine del particolare evidenziato come nuovo file.

▶Selezionare «Selection (snapshot)» (Selezione/istantanea) per creare una copia della schermata del particolare evidenziato come nuovo file.

▶Selezionare «All (snapshot)» (Tutto/istantanea) per creare una copia della schermata dell'immagine intera come nuovo file.

I file salvati si trovano nella finestra di visualizzazione «Experiment Overview» (Panoramica esperimento), nel cui menu contestuale sono disponibili i seguenti comandi:

▶Evidenziare un file ed aprire il menu contestuale azionando il tasto destro del mouse.

▶Selezionare «Activate» (Attiva) per visualizzare i dati immagine del file nella finestra di visualizzazione Viewer.

▶Selezionare «New Window» (Nuova finestra) per aprire la ripresa attuale in una seconda finestra di visualizzazione. In questo modo è possibile visualizzare la stessa immagine ad esempio con un'altra tabella di classificazione cromatica.

▶Selezionare «Delete» (Cancella) per cancellare il file.

▶Selezionare «Rename» (Rinomina) per attribuire al file un nuovo nome.

▶Selezionare «Export» (Esporta) per esportare una ripresa nel formato file *.avi.

▶Selezionare «Browse Images» (Sfoglia immagini) per visualizzare tutte le riprese di un esperimento come immagini miniaturizzate sull'interfaccia operatore.

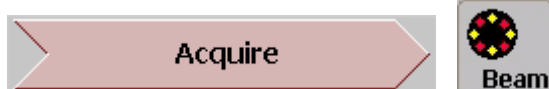
▶Selezionare «Properties» (Proprietà) per inserire una didascalia della ripresa in una finestra di dialogo.

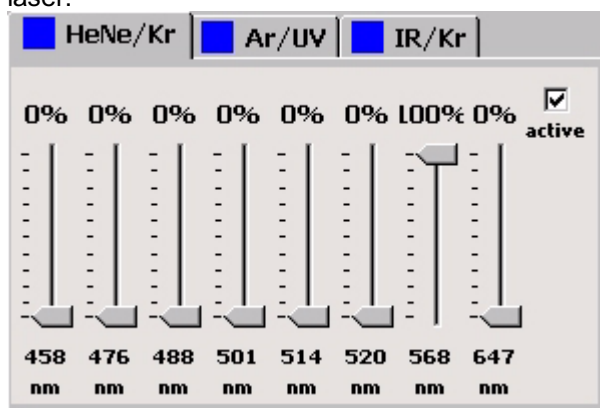
▶È possibile trascinare e spostare file da un esperimento ad un altro (drag and drop = trascina e rilascia) trascinando il file, tenendo premuto il tasto sinistro del mouse, sulla cartella dell'esperimento desiderato.

{tc "Acquisire serie immagini sequenziali"}

Acquisire serie immagini sequenziali

1° passo

Vengono dapprima impostati i parametri di ripresa per il primo metodo di acquisizione, e salvati come set di parametri di ripresa. Per fare questo, fare clic sul simbolo a freccia «**Acquire**» (Acquisizione) ed aprire con il tasto «Beam» (Raggio) la finestra di dialogo «Beam Path Setting» (Impostazione percorso raggio).

2° passo

Selezionare la **lunghezza d'onda di eccitazione** ed impostare l'intensità della traccia laser.

▶Trascinare il regolatore a scorrimento o fare doppio clic sul valore numerico ed immettere un valore d'intensità del laser.

3° passo

Selezionare un **divisore del fascio di eccitazione** appropriato.

Nel caso in cui il sistema sia equipaggiato con un divisore del fascio acusto-ottico (AOBS, Acousto-Optic Beam Splitter), esso ottimizza automaticamente il percorso del raggio alla lunghezza d'onda selezionata.
Altrimenti, fare doppio clic sulla riga verde e selezionare un divisore del fascio:

▶Selezionare la dicroite RSP 500 per acquisizioni di FITC e GFP di lunghezza d'onda di eccitazione di 488 nm ed ampiezza di banda di rilevamento da 500 a 600 nm.

▶Selezionare la dicroite RSP 465 per acquisizioni di CFP con lunghezza d'onda di eccitazione di 458 nm ed ampiezza di banda di rilevamento da 465 a 525 nm.

▶Selezionare la bi-dicroite DD 488 / 543 per acquisizioni di FITC e TRITC oppure GFP e DsRED con lunghezza d'onda di eccitazione di 488 e 543 nm ed ampiezza di banda di rilevamento da 500 a 530 nm, oppure da 555 a 700 nm.

▶Selezionare la tricroite TD 488 / 543 / 633 per acquisizioni di FITC, TRITC e CY5 con lunghezza d'onda di eccitazione di 488, 543 e 633 nm ed ampiezza di banda di rilevamento da 500 a 535 nm, da 555 a 620 nm o da 650 a 750 nm.

▶Selezionare il divisore neutro RT 30/70 per acquisizioni a riflessione.

4° passo

Selezionare un **canale di rilevamento «PMT»** ed impostare il colorante fluorescente utilizzato e l'ampiezza di banda di rilevamento.

▶Fare clic sul campo d'elenco di un canale di rilevamento, ad esempio «PMT2», e selezionare un colorante fluorescente, ad esempio «TRITC». La curva di emissione del colorante fluorescente viene visualizzata nello spettro.

▶Posizionare il regolatore a scorrimento al di sotto della curva di emissione.

Avvertenza sulla posizione della banda di rilevamento

Con riprese a fluorescenza, prestare attenzione a non posizionare la banda di rilevamento al di sotto della traccia laser, dato che in caso contrario la luce di riflessione viene anch'essa acquisita. La distanza della banda di rilevamento dalla traccia laser dev'essere nel campo spettrale blu (linea di eccitazione 488 nm) di almeno 5 nm, nel campo spettrale verde (linea di eccitazione 543 nm) di 10 nm e nel campo spettrale rosso (eccitazione 633 nm) di 15 nm. Se si utilizza l'AOBS, è ancora possibile diminuire la distanza dalla traccia laser, poiché questo divisore del fascio di eccitazione a luce riflessa dispone di una soppressione notevolmente migliore rispetto ai divisori del fascio convenzionali. Per fare questo è però necessario che l'indice di calcolo del campione e del mezzo tra vetrino e obiettivo sia ottimale.

▶Fare doppio clic sul regolatore a scorrimento del canale di rilevamento selezionato.

▶Nella finestra di dialogo «Range Properties» (Proprietà campo) inserire una lunghezza d'onda ciascuno per l'inizio e il termine della banda di rilevamento.

▶Fare clic sul simbolo della tabella di classificazione cromatica.

▶Fare clic su una tabella di classificazione cromatica. Per la prima acquisizione immagini si raccomanda di lavorare con la tabella di classificazione cromatica «Glow(OU)».

& vedi capitolo «Impostare i parametri di ripresa per la prima acquisizione immagini» (pagina 65)

5° passo

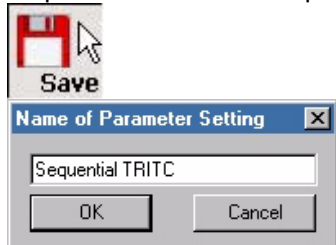
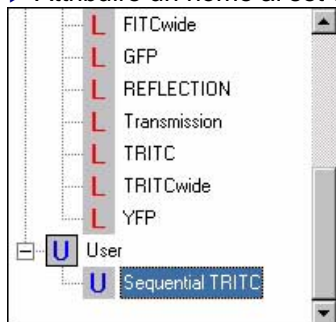
Per ottimizzare la qualità dell'immagine durante l'acquisizione dell'immagine stessa, avviare con il tasto «**Continuous**» (Continua) l'acquisizione immagini in scansione continua.

▶Impostare il piano focale (posizione Z), i rivelatori ed il foro stenopeico di rilevamento. Per questa operazione, leggere i passi da 7 a 15 nel capitolo «Impostare i parametri di ripresa per la prima acquisizione immagini».

& vedi capitolo «Impostare i parametri di ripresa per la prima acquisizione immagini»

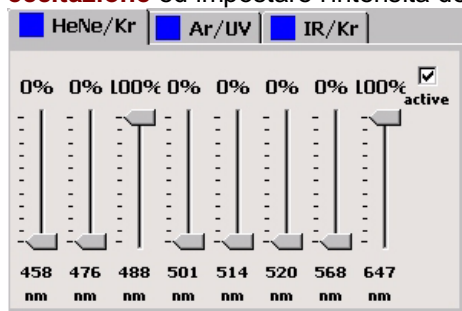
(pagina 65)

6° passo

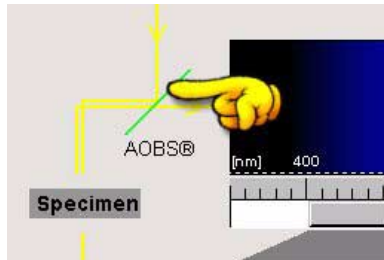
Fare clic nella finestra di dialogo «Beam Path Setting» (Impostazione percorso raggio) sul pulsante «**Save**» (Salva) per salvare le impostazioni del primo metodo di acquisizione come set di parametri di ripresa.

▶Attribuire un nome al set di parametri di ripresa e fare clic su «OK».

Il nuovo set di parametri di ripresa appare nel campo d'elenco sotto «**U**».

& vedi capitolo «Come creare set di parametri di ripresa (IPS) generati dall'utente» (pagina 73)

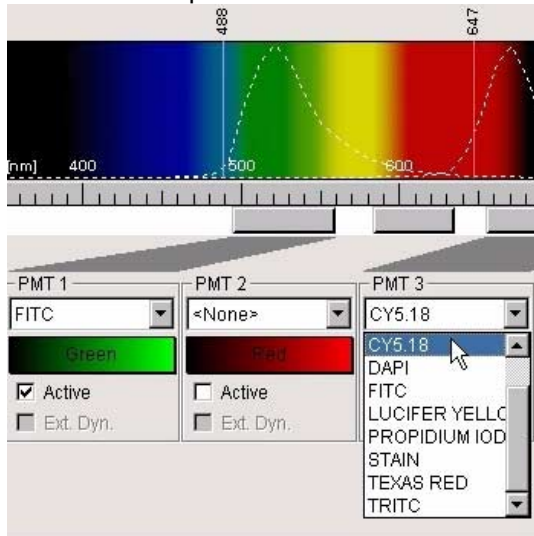
7° passo

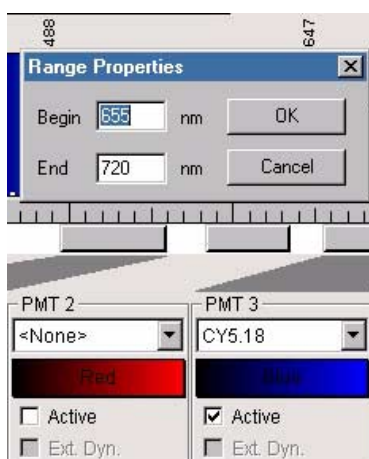
Vengono ora impostati i parametri di ripresa per il secondo metodi di acquisizione, e salvati come set di parametri di ripresa. Selezionare la **lunghezza d'onda di eccitazione** ed impostare l'intensità della traccia laser.

▶Trascinare il regolatore a scorrimento o fare doppio clic sul valore numerico ed immettere un valore d'intensità del laser.

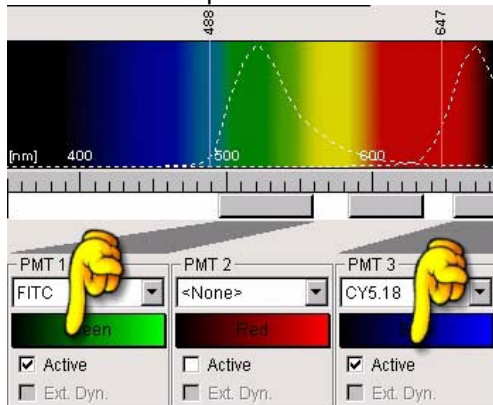
8° passo

Selezionare un **divisore del fascio di eccitazione** appropriato.

▶La descrizione dettagliata dei divisori del fascio disponibili si può trovare nel passo 3.

9° passo

Selezionare un **canale di rilevamento «PMT»** ed impostare il colorante fluorescente utilizzato e l'ampiezza di banda di rilevamento.

▶Fare clic sui campi d'elenco dei canali di rilevamento, ad esempio «PMT1» e «PMT3», e selezionare per ciascuno un colorante fluorescente, ad esempio «FITC» e «CY5». Le curve di emissione dei coloranti fluorescenti vengono visualizzate nello spettro.

▶Posizionare i regolatori a scorrimento al di sotto delle rispettive curve di emissione.

▶Fare doppio clic sul regolatore a scorrimento del canale di rilevamento selezionato.

▶Nella finestra di dialogo «Range Properties» (Proprietà campo) inserire un valore d'onda ciascuno per l'inizio e il termine della banda di rilevamento.

▶Fare clic per ciascuno sul simbolo ella tabella di classificazione cromatica.

▶Fare clic su una tabella di classificazione cromatica e su «OK».
Per la prima acquisizione immagini si raccomanda di lavorare con la tabella di classificazione cromatica «Glow(O&U)».

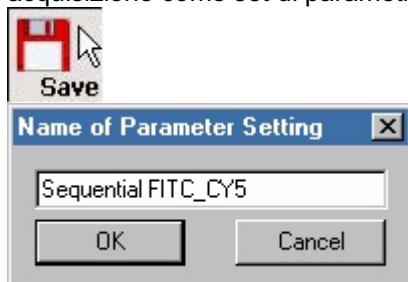
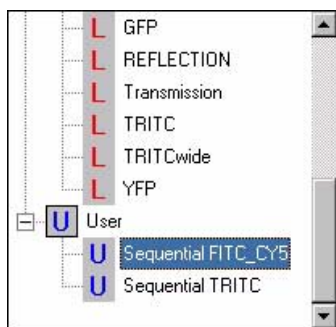
10° passo

Per ottimizzare la qualità dell'immagine durante l'acquisizione dell'immagine stessa, avviare con il tasto «**Continuous**» (Continua) l'acquisizione immagini in scansione continua.

▶Impostare il piano focale (posizione Z), i rivelatori ed il foro stenopeico di rilevamento.
Per questa operazione, leggere i passi da 7 a 15 nel capitolo «Impostare i parametri di ripresa per la prima acquisizione immagini»

& vedi capitolo «Impostare i parametri di ripresa per la prima acquisizione immagini» (pagina 65)

11° passo

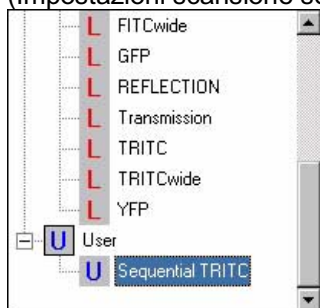
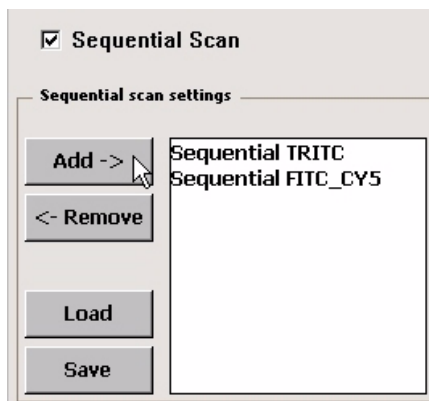
Fare clic nella finestra di dialogo «Beam Path Setting» (Impostazione percorso raggio) sul pulsante «**Save**» (Salva) per salvare le impostazioni del secondo metodo di acquisizione come set di parametri di ripresa.

▶Attribuire un nome al set di parametri di ripresa e fare clic su OK.

Il nuovo set di parametri di ripresa appare nel campo d'elenco sotto «**U**».

12° passo

Fare clic nella finestra di dialogo «Beam Path Setting» (Impostazione percorso raggio) in basso a sinistra su «**Sequential Scan**» (Scansione sequenziale).

Vengono aperti gli elementi di dialogo necessari per l'acquisizione immagini sequenziale.

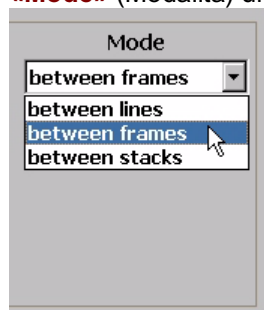
13° passo

Copiare nella finestra di dialogo «Beam Path Setting» (Impostazione percorso raggio) i set di parametri di ripresa nel campo d'elenco «**Sequential scan settings**» (Impostazioni scansione sequenziale).

▶Evidenziare il set di parametri di ripresa nel campo d'elenco in alto a destra nella finestra di dialogo.

▶Fare quindi clic sul pulsante «Add» (Aggiungi) in basso a sinistra nella finestra di

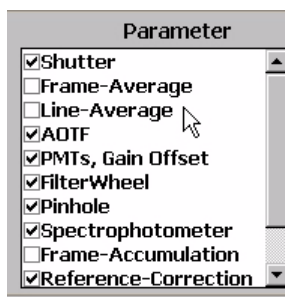
dialogo.
oppure
▶Trascinare e spostare il set di parametri di ripresa (drag and drop = trascina e rilascia) trascinandolo, tenendo premuto il tasto sinistro del mouse, nel campo d'elenco «Sequential scan settings» (Impostazioni scansione sequenziale).
▶Fare clic sul pulsante «Remove» (Rimuovi) per cancellare nuovamente il set di parametri di ripresa.
▶Fare clic sul pulsante «Save» (Salva) per salvare i set di parametri di ripresa come metodo di acquisizione sequenziale.

▶Con il pulsante «Load» (Carica) è possibile caricare nuovamente questo metodo in un secondo tempo.

14° passo

Stabilire quando commutare fra i metodi sequenziali selezionando nel **campo d'elenco «Mode»** (Modalità) una delle tre modalità sequenziali.

▶Selezionare «between lines» (tra le righe) quando il metodo di acquisizione va cambiato dopo l'acquisizione di una riga.
▶Selezionare «between frames» (tra i fotogrammi) quando il metodo di acquisizione va cambiato dopo l'acquisizione di un fotogramma.
▶Selezionare «between stacks» (tra le pile) quando il metodo di acquisizione va cambiato dopo l'acquisizione di una pila d'immagini.

15° passo

Verificare nel **campo d'elenco «Parameter»** (Parametro) i parametri da utilizzare per la ripresa di tutti i metodi di acquisizione sequenziali.

▶Fare clic sulla casella di spunta del parametro desiderato.

16° passo

Impostare ora tutti gli altri parametri di ripresa che differiscono a seconda del tipo di acquisizione: serie immagini spaziale, temporale o spettrale.

17° passo

Avviare con il tasto «**Series**», oppure «Single Scan» (Scansione singola), l'acquisizione immagini sequenziale.

▶Nel caso sia stata selezionata la modalità sequenziale «between lines» (tra le righe), è possibile avviare anche la scansione continua con il tasto «Continuous». La modalità scansione continua ha il pregio di rendere possibile la modifica di molti parametri di ripresa durante l'acquisizione immagini.

▶Fare clic sul tasto «Gallery» (Galleria) per visualizzare già durante l'acquisizione immagini le singole riprese nella finestra di visualizzazione Viewer (Visualizzatore).

18° passo

È possibile collocare nell'esperimento attivo un'**immagine di un canale di rilevamento** o un'immagine in sovrapposizione proveniente da più canali di rilevamento separatamente, come nuovo set di dati.

▶Fare clic sull'immagine del canale di rilevamento desiderato, o sull'immagine in sovrapposizione.

▶Mantenere il puntatore del mouse sulla finestra di visualizzazione Viewer (Visualizzatore) ed aprire il menu contestuale azionando il tasto destro del mouse.

▶Selezionare «Selection (raw)» (Selezione/grezzi) per disporre i dati immagine del

particolare evidenziato come nuovo file.

▶Selezionare «Selection (snapshot)» (Selezione/istantanea) per creare una copia della schermata del particolare evidenziato come nuovo file.

▶Selezionare «All (snapshot)» (Tutto/istantanea)per creare una copia della schermata dell'immagine intera come nuovo file.

I file salvati si trovano nella finestra di visualizzazione «Experiment Overview» (panoramica esperimento), nel cui menu contestuale sono disponibili i seguenti comandi:

▶Evidenziare un file ed aprire il menu contestuale azionando il tasto destro del mouse.

▶Selezionare «Activate» (Attiva) per visualizzare i dati immagine del file nella finestra di visualizzazione Viewer.

▶Selezionare «New Window» (Nuova finestra) per aprire la ripresa attuale in una seconda finestra di visualizzazione. In questo modo è possibile visualizzare la stessa immagine ad esempio con un'altra tabella di classificazione cromatica.

▶Selezionare «Delete» (Cancella) per cancellare il file.

▶Selezionare «Rename» (Rinomina) per attribuire al file un nuovo nome.

▶Selezionare «Export» (Esporta) per esportare una ripresa nel formato file *.avi.

▶Selezionare «Browse Images» (Sfoglia immagini) per visualizzare tutte le riprese di un esperimento come immagini miniaturizzate sull'interfaccia operatore.

▶Selezionare «Properties» (Proprietà) per inserire una didascalia della ripresa in una finestra di dialogo.

▶È possibile trascinare e spostare file da un esperimento ad un altro (drag and drop = trascina e rilascia) trascinando il file, tenendo premuto il tasto sinistro del mouse, sulla cartella dell'esperimento desiderato.

{tc "Acquisizioni immagini di campi di analisi (scansione ROI)"}

Acquisizioni immagini di campi di analisi (scansione ROI)

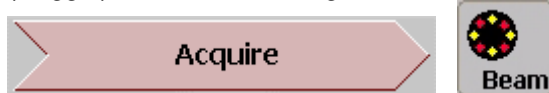
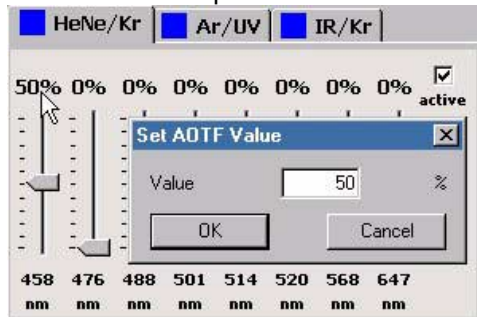
1° passo

Vanno dapprima ottimizzati tutti i parametri di ripresa per la ripresa dell'immagine intera. Per fare questo durante l'acquisizione immagini, avviare con il tasto «**Continuous**» (Continua) l'acquisizione immagini in scansione continua.

▶Impostare il piano focale (posizione Z), i rivelatori ed il foro stenopeico di rilevamento. Per questa operazione, leggere i passi da 7 a 15 nel capitolo «Impostare i parametri di ripresa per la prima acquisizione immagini»

& vedi capitolo «Impostare i parametri di ripresa per la prima acquisizione immagini» (pagina 65)

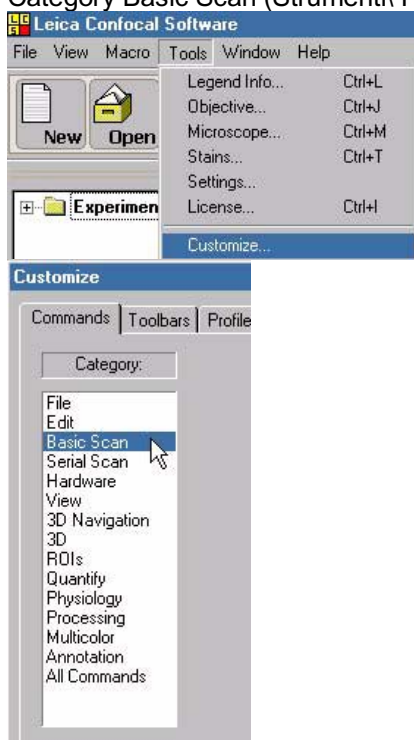
2° passo

Fare clic sul simbolo a freccia «**Acquire**» (Acquisizione) ed aprire con il tasto «Beam» (Raggio) la finestra di dialogo «Beam Path Setting» (Impostazione percorso raggio).

▶Selezionare per lo sfondo immagine (immagine intera) la lunghezza d'onda di eccitazione ed impostare l'intensità della traccia laser.

▶Trascinare il regolatore a scorrimento o fare doppio clic sul valore numerico ed immettere un valore d'intensità del laser. Se lo sfondo deve essere nero, portare tutte le lunghezze d'onda di eccitazione a 0 %.

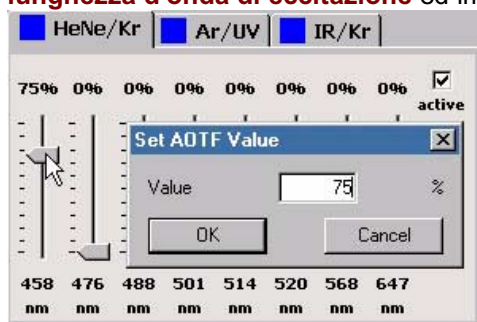
3° passo

Fare clic sul tasto «**ROI**» per salvare l'impostazione del laser per lo sfondo immagine.

Azionando questo tasto vengono automaticamente attivati i tasti necessari per i passi successivi:

▶Nel caso il tasto «ROI» non dovesse essere individuabile nell'interfaccia operatore sotto la categoria «Acquire» (Acquisizione), selezionare Tools\ Customize\ Commands\ Category Basic Scan (Strumenti\ Personalizza\ Comandi \ Categoria Scansione Base).

▶Fare clic sul tasto «ROI» e trascinarlo, tenendo premuto il tasto sinistro del mouse, sull'interfaccia operatore.

4° passo

Selezionare, per il campo di analisi (ROI) da tracciare nel passo successivo, la **lunghezza d'onda di eccitazione** ed impostare l'intensità della traccia laser.

▶Trascinare il regolatore a scorrimento o fare doppio clic sul valore numerico ed immettere un valore d'intensità del laser.

Avvertenza

È possibile utilizzare più tracce laser per l'eccitazione di un campo di analisi (ROI). È però possibile impostare un solo valore d'intensità per ciascuna traccia laser, che verrà utilizzato per tutti i campi di analisi.

5° passo

Per tracciare il primo campo di analisi nell'immagine intera, fare clic sul simbolo a freccia «**Quantify**» (Quantificazione), quindi ad esempio sul tasto «Wizard» (Procedura guidata) e sul tasto «Polygon» (Poligono).

▶Fare doppio clic nell'immagine su una struttura da definire come campo di analisi. I contorni della struttura vengono automaticamente evidenziati come campo di analisi.

▶Con i tasti «Select» (Seleziona) e «Rotate» (Ruota) è possibile spostare o ruotare i campi di analisi e variarne le dimensioni; con il tasto «Clear» (Cancella) è possibile cancellare tutti i campi di analisi.

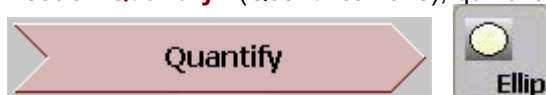
6° passo

Selezionare per un secondo campo di analisi la **lunghezza d'onda di eccitazione** ed impostare l'intensità della traccia laser.

▶Trascinare il regolatore a scorrimento o fare doppio clic sul valore numerico ed immettere un valore d'intensità del laser.

È possibile utilizzare più tracce laser per l'eccitazione di un campo di analisi (ROI). È però possibile impostare un solo valore d'intensità per ciascuna traccia laser, che verrà utilizzato per tutti i campi di analisi.

7° passo

Per tracciare il secondo campo di analisi nell'immagine intera, fare clic sul simbolo a freccia «**Quantify**» (Quantificazione), quindi ad esempio sul tasto «Ellipse» (Ellisse).

▶Disattivare il tasto «Wizard» nel caso si desideri tracciare a mano i campi di analisi nell'immagine.

▶Con i tasti «Select» e «Rotate» è possibile spostare o ruotare i campi di analisi e variarne le dimensioni; con il tasto «Clear» è possibile cancellare tutti i campi di analisi.

8° passo

Ripetere questa procedura, descritta nei passi da 4 a 7, per ogni ulteriore campo di analisi che si desideri definire nell'immagine.

9° passo

Fare quindi clic sul tasto «**Configuration**» (Configurazione) per ottenere una panoramica dei campi di analisi definiti e delle tracce laser associate.

▶In questa fase è eventualmente possibile modificare nuovamente l'associazione delle tracce laser ai campi di analisi.

10° passo

Avviare con il tasto «**Series**» (Serie) la serie immagini.

▶Per migliorare il rapporto segnale/rumore, fare clic sul tasto «Average» (Media). Stabilire con quale frequenza vada ripetuta l'acquisizione di un'immagine. Viene indicato di volta in volta il valore medio.

▶Per migliorare il rapporto segnale/rumore, fare clic sul tasto «Line Average» (Media riga). Stabilire con quale frequenza vada ripetuta l'acquisizione di una riga. Viene indicato di volta in volta il valore medio.

▶Fare clic sul tasto «Gallery» (Galleria) per visualizzare già durante l'acquisizione immagini le singole riprese nella finestra di visualizzazione Viewer (Visualizzatore).

11° passo

È possibile collocare nell'esperimento attivo un'**immagine di un canale di rilevamento** o un'immagine in sovrapposizione proveniente da più canali di rilevamento separatamente, come nuovo set di dati.

▶Fare clic sull'immagine del canale di rilevamento desiderato, o sull'immagine in sovrapposizione.

▶Mantenere il puntatore del mouse sulla finestra di visualizzazione Viewer (Visualizzatore) ed aprire il menu contestuale azionando il tasto destro del mouse.

▶Selezionare «Selection (raw)» (Selezione/grezzi) per disporre i dati immagine del particolare evidenziato come nuovo file.

▶Selezionare «Selection (snapshot)» (Selezione/istantanea) per creare una copia della schermata del particolare evidenziato come nuovo file.

▶Selezionare «All (snapshot)» (Tutto/istantanea) per creare una copia della schermata dell'immagine intera come nuovo file.

I file salvati si trovano nella finestra di visualizzazione «Experiment Overview» (Panoramica esperimento), nel cui menu contestuale sono disponibili i seguenti comandi:

▶Evidenziare un file ed aprire il menu contestuale azionando il tasto destro del mouse.

▶Selezionare «Activate» (Attiva) per visualizzare i dati immagine del file nella finestra di visualizzazione Viewer.

▶Selezionare «New Window» (Nuova finestra) per aprire la ripresa attuale in una seconda finestra di visualizzazione. In questo modo è possibile visualizzare la stessa immagine ad esempio con un'altra tabella di classificazione cromatica.

▶Selezionare «Delete» (Cancella) per cancellare il file.

▶Selezionare «Rename» (Rinomina) per attribuire al file un nuovo nome.

▶Selezionare «Export» (Esporta) per esportare una ripresa nel formato file *.avi.

▶Selezionare «Browse Images» (Sfoglia immagini) per visualizzare tutte le riprese di un esperimento come immagini miniaturizzate sull'interfaccia operatore.

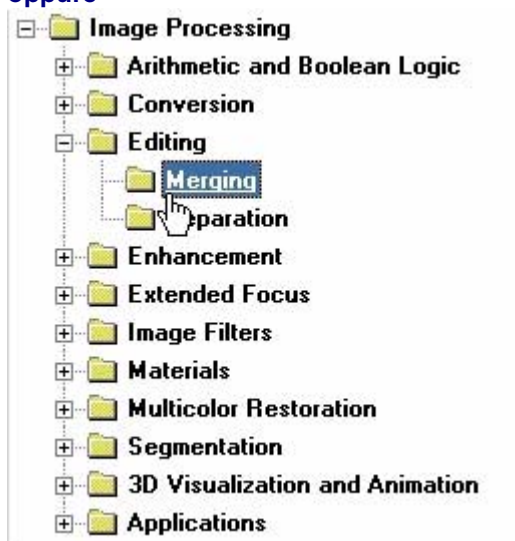
▶Selezionare «Properties» (Proprietà) per inserire una didascalia della ripresa in una finestra di dialogo.

▶È possibile trascinare e spostare file da un esperimento ad un altro (drag and drop = trascina e rilascia) trascinando il file, tenendo premuto il tasto sinistro del mouse, sulla cartella dell'esperimento desiderato.

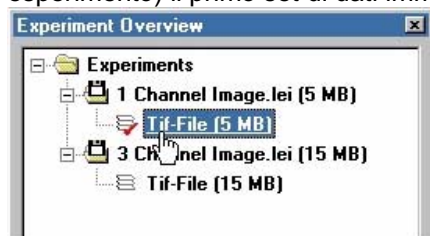
Combinare fotogrammi o serie immagini

1° passo

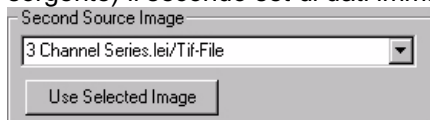
Fare clic sul simbolo a freccia «**Process**» (Elabora), quindi sulla zona pagina «Editing» (Modifica) e sulla zona pagina «Merging» (Fusione).

oppure

▶Selezionare nella finestra di navigazione in basso a sinistra nell'interfaccia operatore : «Image Processing\ Editing\ Merging» (Elaborazione immagine\ Modifica\ Fusione).

2° passo

Selezionare nella finestra di visualizzazione «**Experiment Overview**» (Panoramica esperimento) il primo set di dati immagini facendo un doppio clic su di esso:

▶Il set di dati immagini attivo è contrassegnato con una spunta rossa

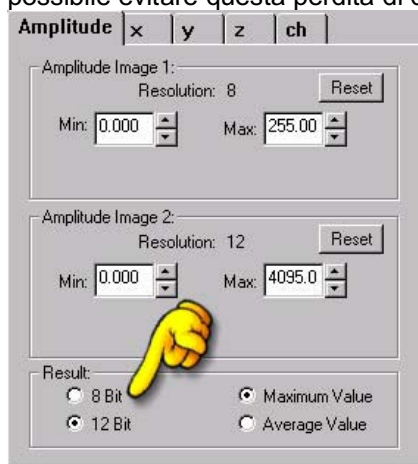
3° passo

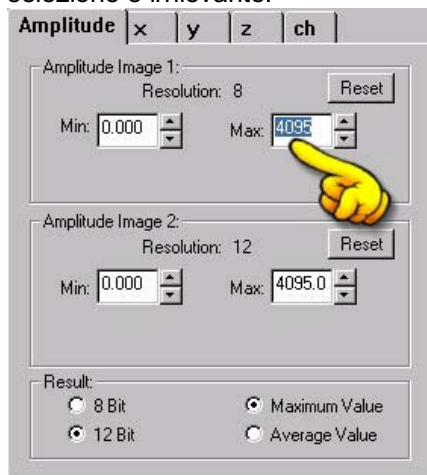
Selezionare nel campo d'elenco «**Second Source Image**» (Seconda immagine sorgente) il secondo set di dati immagini.

▶Facendo clic sul pulsante «Use Selected Image» (Usa l'immagine selezionata), verrà utilizzato il set di dati immagini selezionato nella finestra di visualizzazione «Experiment Overview» (Panoramica esperimento).

4° passo

Controllare nel registro «**Amplitude**» (Ampiezza) la profondità di bit dei due set di dati immagini che si desidera combinare.

Immagini finali nere in fase di combinazione

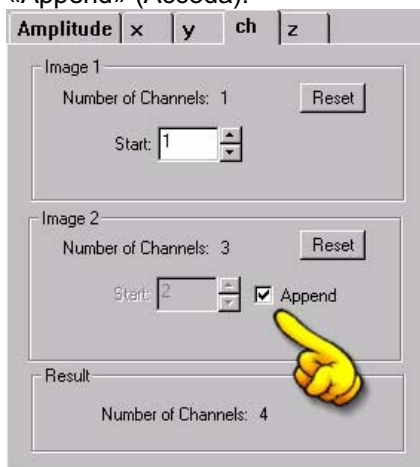
In fase di combinazione di set di dati immagini che presentino differenti profondità di bit (8 bit o 12 bit), a causa della mediatura della differente risoluzione possono formarsi immagini scure o nere. Tramite una normalizzazione su una risoluzione di bit generale è possibile evitare questa perdita di dinamica.

▶Selezionare nel campo «Result» (Risultato) la profondità di bit che dovrà avere il nuovo set di dati immagini: «8 Bit» oppure «12 Bit».

▶Nel caso si sovrappongano immagini, selezionare nel campo «Result» (Risultato) «Maximum Value» (Valore massimo) oppure «Average Value» (Valore medio), per stabilire se nell'immagine risultante vada rappresentato il valore massimo oppure il valore medio dei due set di dati di immagini. Se con la funzione «Append» (Accoda) le immagini si accodano solamente l'una all'altra (vedi sotto per la descrizione), questa selezione è irrilevante.

▶Correggere inoltre manualmente nel campo d'inserimento l'indicazione di bit del set di dati immagini che va adattato alla profondità di bit dell'altro set di dati immagini.

Combinare i canali di rilevamento di due set di dati immagini

1° passo

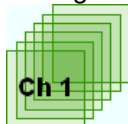
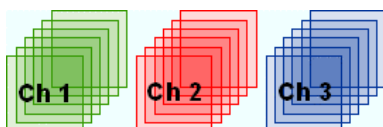
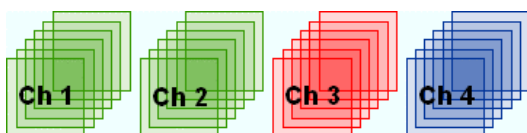
Se si desidera accodare i **canali di rilevamento** di due set di dati immagini in un nuovo

set di dati immagini, selezionare nel registro «ch» solamente la casella di spunta «Append» (Accoda).

▶Dietro il canale di rilevamento del primo set di dati immagini («Image 1» - Immagine 1) vengono inseriti i canali di rilevamento del secondo set di dati immagini («Image 2» - Immagine 2):

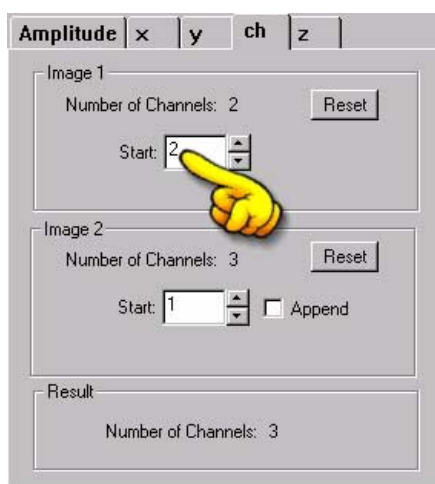
Set di dati immagini 1 («Image 1»)

+

Set di dati immagini 2 («Image 2»)

=

Nuovo set di dati immagini

2° passo

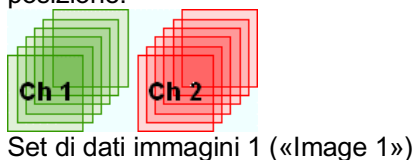
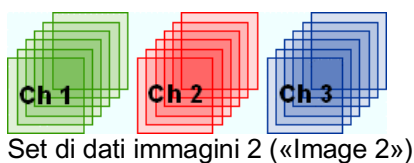
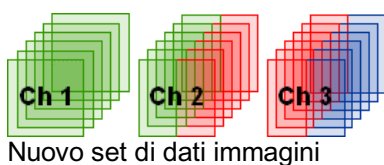
Se si desidera sovrapporre i **canali di rilevamento** di due set di dati immagini in un nuovo set di dati immagini, definire nel registro «ch», nel campo d'inserimento «Start» (Avvio), la posizione che ciascun set di dati immagini dovrà avere nell'immagine finale.

▶I canali di rilevamento del primo set di dati immagini («Image 1») verranno inseriti nel nuovo set di dati immagini a partire dalla seconda posizione; i canali di rilevamento del secondo set di dati immagini («Image 2») verranno inseriti a partire dalla prima posizione:

Set di dati immagini 1 («Image 1»)

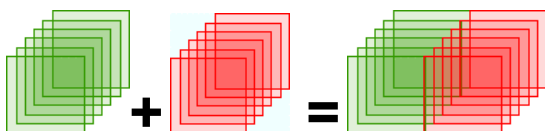
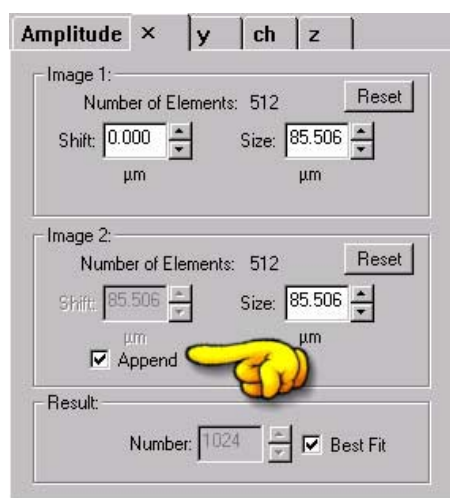
+

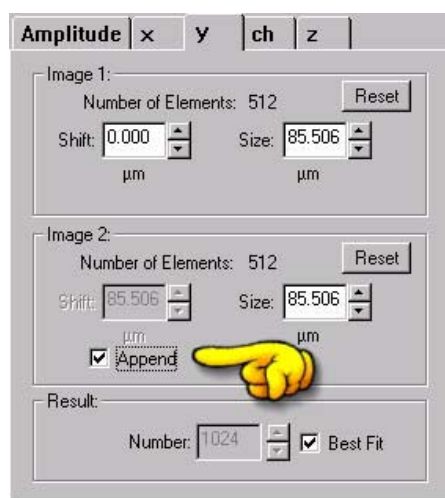
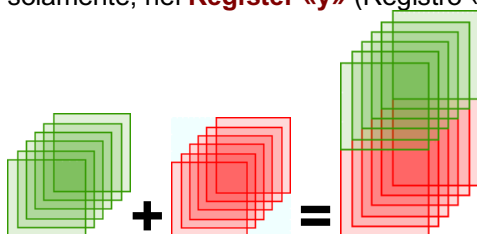
Set di dati immagini 2 («Image 2»)

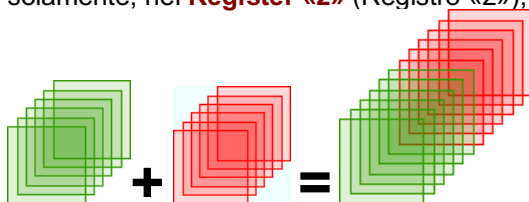
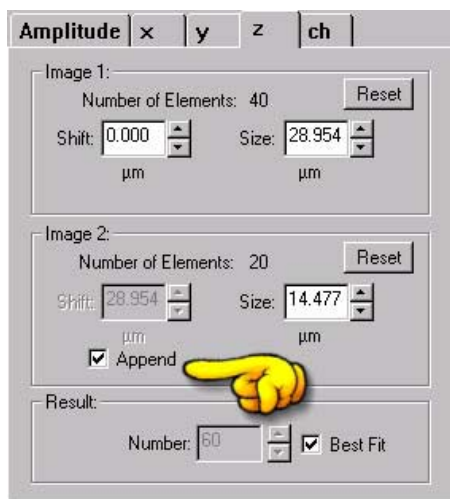
=

Nuovo set di dati immagini

Combinare due fotogrammi o serie immagini

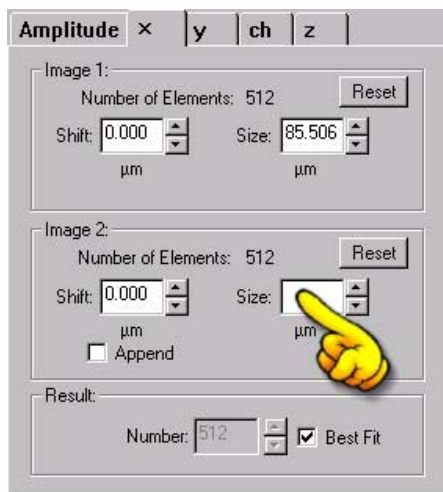
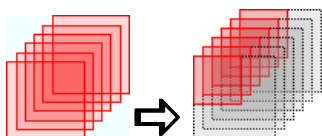
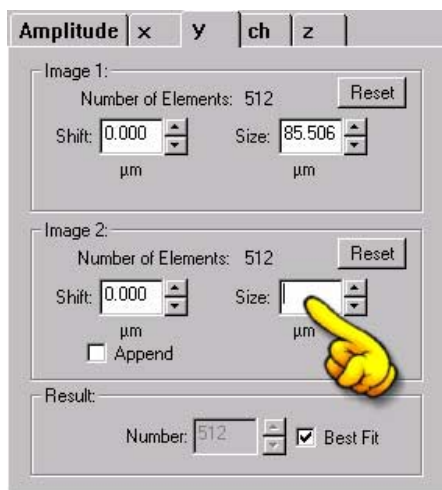
1° passo

Se si desidera accodare orizzontalmente due fotogrammi o serie di immagini, selezionare solamente, nel **Register «x»** (Registro "x"), la casella di spunta «Append» (Accoda).

2° passo

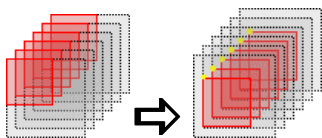
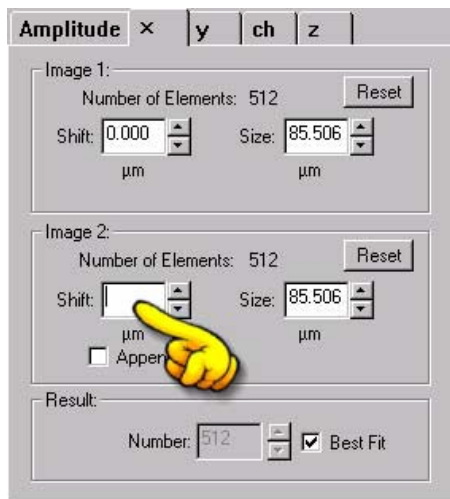
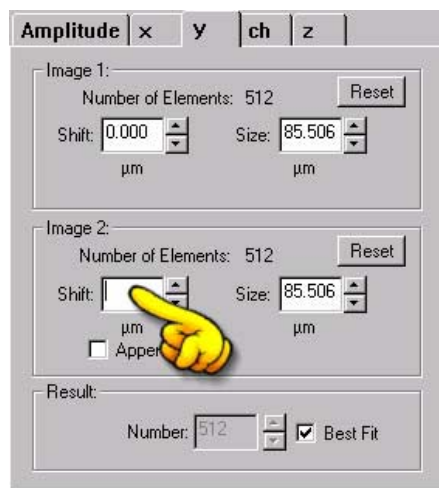
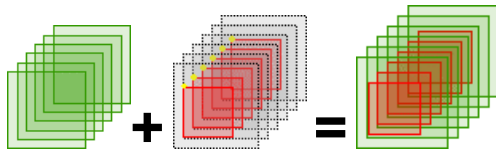
Se si desidera accodare verticalmente due fotogrammi o serie di immagini, selezionare solamente, nel **Register «y»** (Registro «y»), la casella di spunta «Append» (Accoda).

3° passo

Se si desidera combinare in serie due fotogrammi o serie di immagini, selezionare solamente, nel **Register «z»** (Registro «z»), la casella di spunta «Append».

Rimpicciolire le immagini e integrarle in una seconda serie di immagini

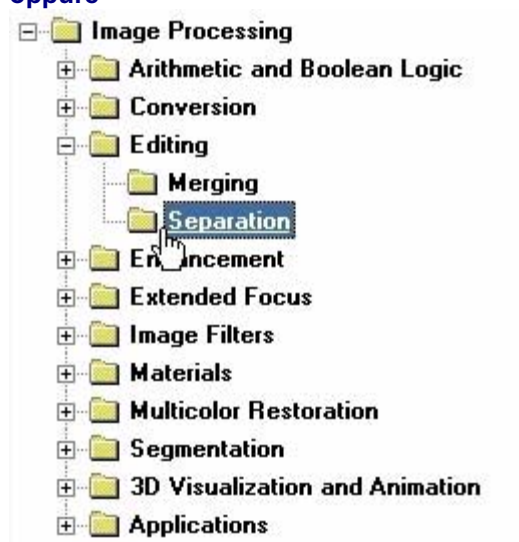
1° passo

Correggere, nel **Register «x»** (Registro «x») e nel Register «y» (Registro «y»), le dimensioni del set di dati immagini che si desidera rimpicciolire.

▶Inserire nel campo Size (Dimensioni) il nuovo valore di larghezza dell'immagine.

▶Inserire nel campo Size (Dimensioni) il nuovo valore di lunghezza dell'immagine.

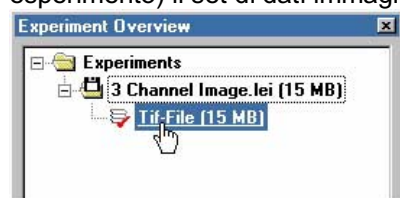
2° passo

Definire, nel **Register «x»** (Registro «x») e nel Register «y» (Registro «y»), la posizione che dovrà avere l'immagine rimpiccolita nell'immagine finale.

Il punto di riferimento è l'angolo in alto a sinistra dell'immagine.

▶Inserire nel campo Shift (Spostamento) la nuova coordinata x del punto di riferimento.

▶Inserire nel campo Shift (Spostamento) la nuova coordinata y del punto di riferimento.

Separare fotogrammi o serie di immagini

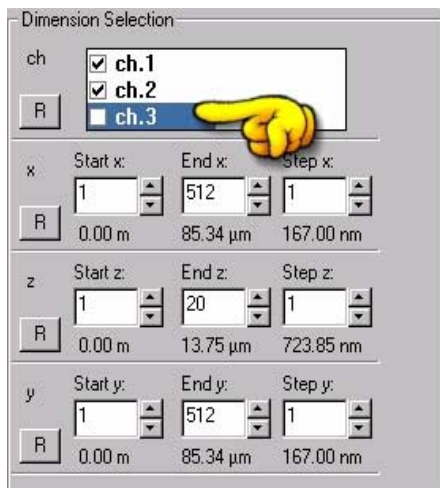
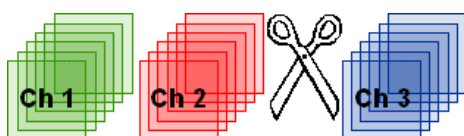
1° passo

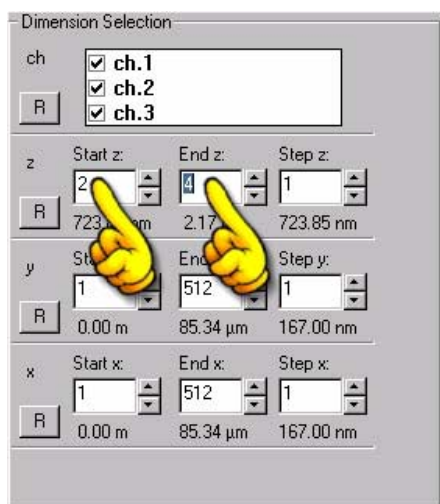
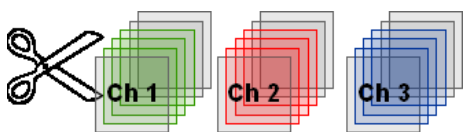
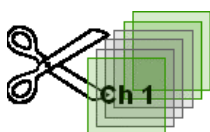
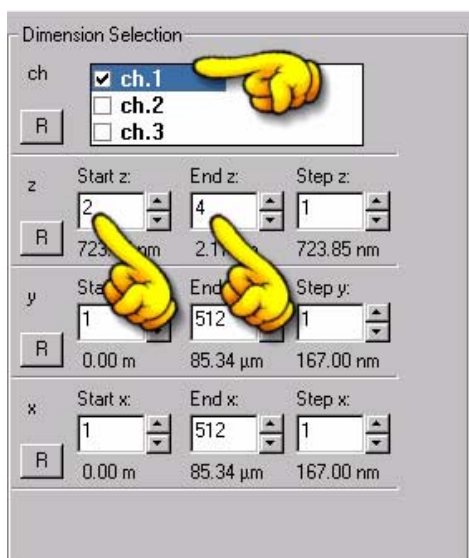
Fare clic sul simbolo a freccia «**Process**» (Elabora), quindi sulla zona pagina «Editing» (Modifica) e sulla zona pagina «Separation» (Separazione).

▶Selezionare nella finestra di navigazione in basso a sinistra nell'interfaccia operatore : «Image Processing\ Editing\ Separation» (Elaborazione immagine\ Modifica\ Separazione).

2° passo

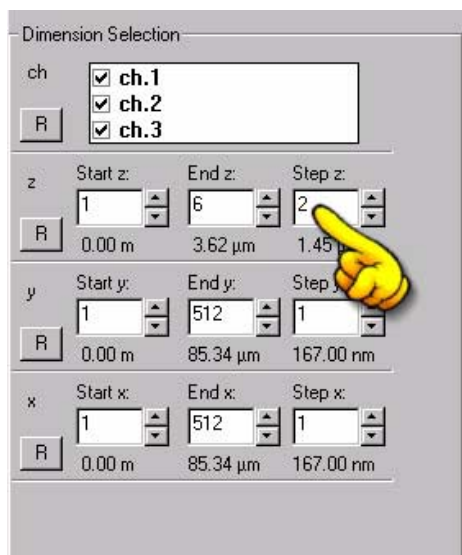
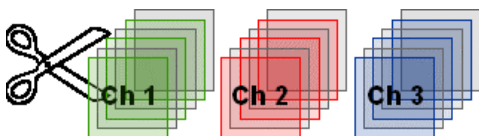
Selezionare nella finestra di visualizzazione «**Experiment Overview**» (Panoramica esperimento) il set di dati immagini desiderato facendo un doppio clic su di esso:

▶Il set di dati immagini attivo è contrassegnato con una spunta rossa

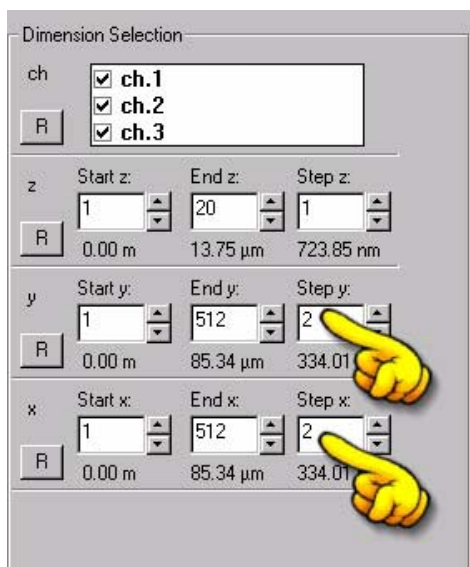
3° passo

Se si desidera estrarre tutte le immagini di un **canale di rilevamento** da un set di dati immagini, attivare nel campo «ch» la casella di spunta del canale desiderato e disattivare le altre.

4° passo

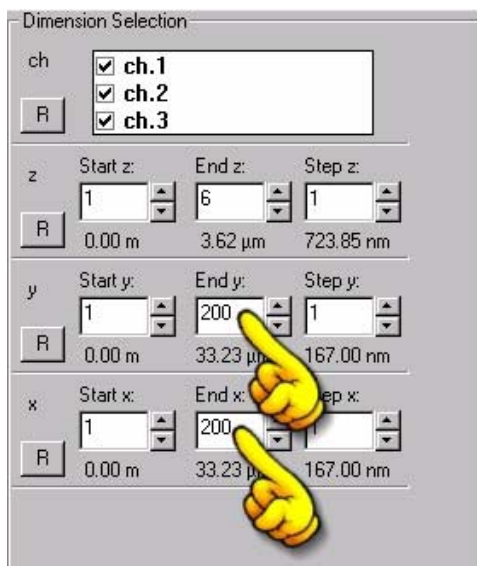
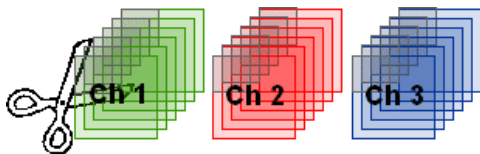
Se si desidera estrarre **singole immagini** di una serie di immagini, selezionare nei campi d'inserimento «Start z» (Avvia z) ed «End z» (Termina z) le immagini corrispondenti.

▶Le immagini da 2 a 4 vengono estratte in tutti i canali di rilevamento.

▶Le immagini da 2 a 4 vengono estratte nel solo canale di rilevamento 1.

5° passo

Se, ad esempio, si desidera estrarre **un'immagine ogni due** in tutti i canali di rilevamento di un set di dati immagine, inserire nel campo d'inserimento «Step z» (Intervallo z) il valore «2».

6° passo

Se si desidera rimpicciolire il **formato** di un'immagine, inserire nei campi d'inserimento «Step x» (Intervallo x) e «Step y» (Intervallo y), ad esempio, il valore «2».

▶Un pixel su due dell'immagine verrà estratto. Il formato immagine dell'immagine finale verrà ridotto a 256 x 256.

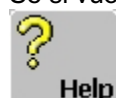
7° passo

Se si desidera estrarre un **particolare** di un'immagine, definire nei campi d'inserimento «Start x» (Avvia x) ed «End x» (Termina x), e «Start y» (Avvia y) ed «End y» (Termina y), lunghezza e larghezza del particolare.

Informazioni generali

Introduzione alla guida del Leica Confocal Software

Sono a disposizione i seguenti esempi di guida:

Guida rapida
Lasciando il puntatore per un certo tempo su un tasto del Leica Confocal Software, compare una breve spiegazione della funzione del pulsante. La breve spiegazione (help banner) scompare di nuovo automaticamente quando si muove il puntatore.

Guida contestualizzata
Se si vuole utilizzare la funzione di Guida contestualizzata, fare clic sul tasto Help:

Tutta l'interfaccia utente si blocca e, accanto al puntatore, compare un punto di domanda. Se quindi si fa clic su un tasto a scelta, al posto delle funzioni di comando normalmente attivate premendo il tasto, viene visualizzata una spiegazione del pulsante specifico. Se il tasto Help (guida) non è presente sul proprio interfaccia utente:

▶	Nel menu Tools (Strumenti), selezionare l'opzione Customize (Personalizza). Qui si trovano tutti i tasti ordinati per categorie.
▶	Nella categoria File si trova il tasto Help.
▶	Fare clic sul pulsante con il tasto sinistro del mouse, tenere premuto il tasto del mouse e tirare il tasto nella finestra desiderata.

Contenuto della Guida in linea (Contents)
Selezionando l'opzione Contents (contenuti) nel menu Help, viene visualizzato l'indice della Guida in linea. A questo punto si possono selezionare le funzioni per le quali si desidera ricevere un supporto.

Ricerca per concetti chiave (Index)
Selezionando l'opzione Index (Indice) nel menu Help, compare una directory contenente i vari concetti chiave. Selezionando uno di questi concetti chiave; facendo doppio clic con il mouse o premendo il pulsante Display (Visualizza), si accede alle pagine corrispondenti.

Ricerca a tutto testo con concetti chiave interconnessi logicamente (Search)
Selezionando l'opzione Search (Ricerca) nel menu Help, viene avviato il motore di ricerca interno a tutto testo. Nella finestra di scrittura si può inserire un concetto da ricercare. Facendo clic sul triangolo a destra, accanto alla finestra di scrittura, vengono visualizzati gli operatori logici. Selezionare l'operatore specifico. Dopo l'operatore, immettere il secondo concetto di ricerca da collegare al primo:

Esempi	Risultato
Diaframma a foro AND sezioni	Questo statement ricerca le tematiche di guida in cui figura sia la parola «diaframma a foro» sia la parola «sezioni».
Diaframma a foro OR sezioni	Questo statement ricerca le tematiche di guida in cui figura la parola «diaframma a foro» o la parola «sezioni», oppure entrambe.
Diaframma a foro NEAR sezioni	Questo statement ricerca le tematiche di guida in cui la parola «diaframma a foro» e la parola «sezioni» si trovano in un determinato raggio di ricerca. Inoltre vengono cercati anche concetti scritti in modo simile.
Diaframma a foro NOT sezioni	Questo statement ricerca le tematiche di guida in cui si trova la parola «diaframma a foro» e non la parola «sezioni».

Segnalibro (Favorites)

Selezionando il registro Favorites (Preferiti) nella finestra
di dialogo della Guida in linea, si può registrare la tematica di guida attuale in una lista. Tramite le voci di questa lista, si può accedere in modo molto rapido alle tematiche di guida selezionate.

Aprire la Guida contestualizzata

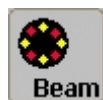
Funzione
Con il tasto Help si attiva la funzione di Guida contestualizzata della Guida in linea, con la quale si possono richiamare brevi spiegazioni per i diversi tasti e le varie funzioni del Leica Confocal Software.

▶	Fare clic sul tasto Help.
▶	Accanto al puntatore del mouse compare un punto di domanda. Tutti i tasti sono ora provvisoriamente senza funzione.
▶	Con il puntatore, fare clic sul tasto per il quale si desidera avere informazioni più specifiche.
▶	Si apre la Guida in linea con la descrizione del tasto in questione.

Nella Guida in linea, si possono ricercare determinati argomenti o tasti tramite un indice di parole chiave e una funzione di ricerca. Le singole descrizioni possono essere stampate.

La Guida in linea può essere aperta anche facendo clic nel menu Help su una delle opzioni Contents (Contenuti), Search (Ricerca) o Index (Indice).

Funzioni di acquisizione dati

Impostare il percorso del raggio

Funzione
Con il tasto Beam (Raggio) si apre la finestra di dialogo Beam Path Setting (Impostazione percorso del raggio), dove si possono regolare il percorso del raggio e i rivelatori con le relative tabelle di classificazione cromatica per la registrazione.

Selezionare la lunghezza d'onda di eccitazione
Sopra lo spettro, nella finestra di dialogo, si trovano i campi per l'impostazione della lunghezza d'onda di eccitazione tramite un AOTF:

▶	Fare clic sulla casella di spunta accanto alla denominazione del laser, per attivarlo.
▶	Impostare la portata della traccia laser, tirando il cursore della relativa scala al valore desiderato o
▶	Facendo doppio clic sul valore percentuale della portata del laser. Si apre un'altra finestra di dialogo dove si può immettere il valore esatto.
▶	La traccia laser attiva viene visualizzata nello spettro come una linea.

Caricare e salvare le impostazioni dei parametri
Sempre sopra lo spettro, si trova un campo d'elenco in cui si possono caricare e salvare le impostazioni dei parametri. Per le principali combinazioni di coloranti fluorescenti sono disponibili impostazioni dei parametri predefinite. Queste impostazioni dei parametri, contrassegnate con una **L** (Leica), possono essere soltanto caricate, ma non modificate.

Le impostazioni effettuate per una registrazione specifica possono essere anche salvate come parametro definito dall'utente, e caricate in qualsiasi momento con un semplice clic:

▶	Fare clic sul pulsante Save (Salva).
▶	Si apre una finestra di dialogo dove immettere un nome da attribuire all'impostazione del parametro.
▶	L'impostazione del parametro viene salvata nel campo d'elenco sotto User (utente), e viene contrassegnata con una **U** (User).

I parametri da salvare con il comando Save possono essere selezionati nel seguente modo:

▶	Nel menu Tools (Strumenti), selezionare l'opzione Settings (Impostazioni).
▶	Nella finestra di dialogo Settings, fare clic sul registro Instrument Parameters (Parametri strumento).
▶	Selezionare il parametro facendo clic sulla casella di spunta corrispondente. Con i pulsanti Select all (Seleziona tutto) e Deselect all (Deseleziona tutto), si possono selezionare o annullare tutti i parametri.

Facendo clic su una di queste impostazioni di parametro definire dall'utente o preimpostate, e poi sul tasto destro del mouse, compare un menu contestuale con i seguenti comandi a disposizione:

Comando	Funzione
Set as default setting	L'impostazione di parametro viene caricata come impostazione standard durante l'avvio del software.

Remove default setting	L'identificazione di impostazione standard viene annullata.
Load	L'impostazione di parametro viene caricata.
Rename (solo con **U**)	L'impostazione di parametro può essere rinominata.
Delete (solo con **U**)	L'impostazione di parametro viene cancellata.

Selezionare un divisore del fascio di eccitazione
Il divisore del fascio di eccitazione guida la luce di eccitazione del laser sul preparato e separa da quest'ultimo la luce fluorescente di ritorno e la luce di eccitazione riflessa.

Se il sistema confocale è dotato di un divisore acusto-ottico del fascio AOBS (Acousto-Optical Beam Splitter), quest'ultimo, con la selezione di una o più tracce laser, viene automaticamente impostato per una trasmissione massima della luce fluorescente e una soppressione massima della luce riflessa.

& vedi Impostare il divisore acusto-ottico del fascio (AOBS) (pagina 142)

Se il sistema confocale è dotato di divisori del fascio di eccitazione convenzionali, occorre selezionare un filtro adatto all'applicazione specifica. A sinistra, accanto allo spettro, si trova il simbolo (linea verde rovesciata) del divisore del fascio di eccitazione. Farvi clic sopra e selezionare il divisore del fascio desiderato:

▶	I filtri neutri, quali ad esempio il filtro RT 30/70, vengono usati con le applicazioni di riflessione per condurre la luce di eccitazione sul campione e la luce riflessa verso il foro stenopeico di rilevamento.
▶	I filtri dicroici, come ad esempio il filtro passa-corto di riflessione RSP 510, vengono usati con le applicazioni di fluorescenza per separare la luce fluorescente di un determinato campo di lunghezze d'onda dalla luce di eccitazione e rilevarla.
▶	I filtri bi-dicroici vengono usati per acquisizioni di immagini in cui il preparato viene marcato con due coloranti fluorescenti ed eccitato con due lunghezze d'onda di eccitazione. Con la bi-dicroite DD 488/ 568, per esempio, la luce di eccitazione viene separata dalla luce di rilevamento con la lunghezza d'onda di 488nm e di 568nm. A seconda della configurazione del sistema, si possono anche selezionare le bi-dicroiti tipo DD 488/ 543 e DD 458/ 514.
▶	I filtri tricroici vengono usati per acquisizioni di immagini in cui il preparato viene marcato con tre coloranti fluorescenti ed eccitato con tre lunghezze d'onda di eccitazione. Con la tricroite TD 488/ 568/ 633, per esempio, la luce di eccitazione viene separata dalla luce di rilevamento con la lunghezza d'onda di 488nm, 568nm e 633nm. A seconda della configurazione del sistema, si possono anche selezionare le tricroiti tipo TD 488/ 568/ 647 e TD 488/ 543/ 633.

Impostare i rivelatori e le tabelle di classificazione cromatica (LUT)
Sotto allo spettro, nella finestra di dialogo, sono ordinati i campi relativi ai quattro rivelatori PMT 1- 4 e al rivelatore di luce trasmessa PMT Trans. Effettuare le seguenti impostazioni:

▶	Attivare il rivelatore desiderato facendo clic sulla relativa casella di spunta Active (Attivo) sotto al simbolo delle tabelle di classificazione cromatica. Un'ombra di proiezione collega ora il rivelatore attivato con il relativo cursore sulla scala dello spettro.
▶	Determinare il campo di lunghezze d'onda in cui si deve rilevare tirando i due lati del cursore e portandoli alle posizioni desiderate sulla scala, oppure
▶	Facendo doppio clic sul cursore. Si apre un'altra finestra di dialogo in cui si può immettere il valore esatto per punto iniziale e punto finale del campo di lunghezze d'onda.
▶	Con le applicazioni di fluorescenza, per ogni rivelatore si aprono campi d'elenco con i coloranti fluorescenti utilizzabili. Selezionare il colorante fluorescente desiderato per visualizzare la sua curva di emissione nello spettro.
▶	Selezionare una tabella di classificazione cromatica facendo clic sul relativo simbolo.

& vedi Selezionare le tabelle di classificazione cromatica (LUT) (pagina 197)

Impostare il divisore acusto-ottico del fascio (AOBS) (opzionale)

In questa pagina vengono trattati i seguenti argomenti

- Funzione del divisore acusto-ottico del fascio
- Impiego dell'AOBS con riprese a fluorescenza
- Impiego dell'AOBS con riprese miste a riflessione/fluorescenza

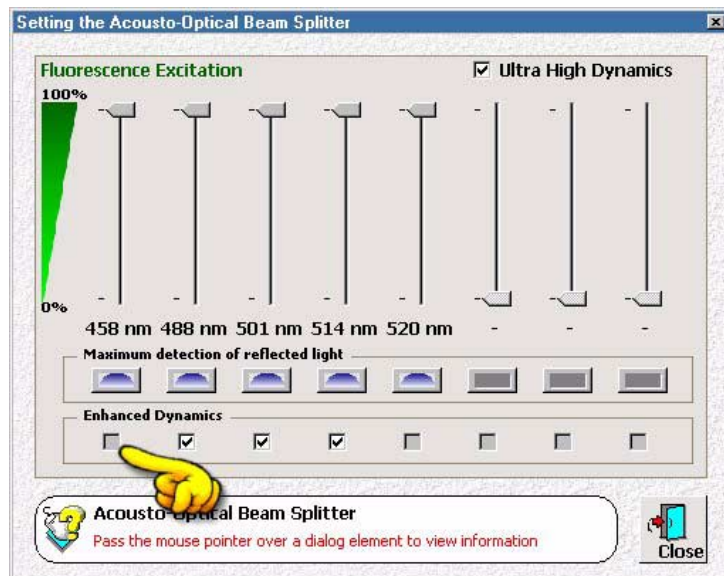
Funzione

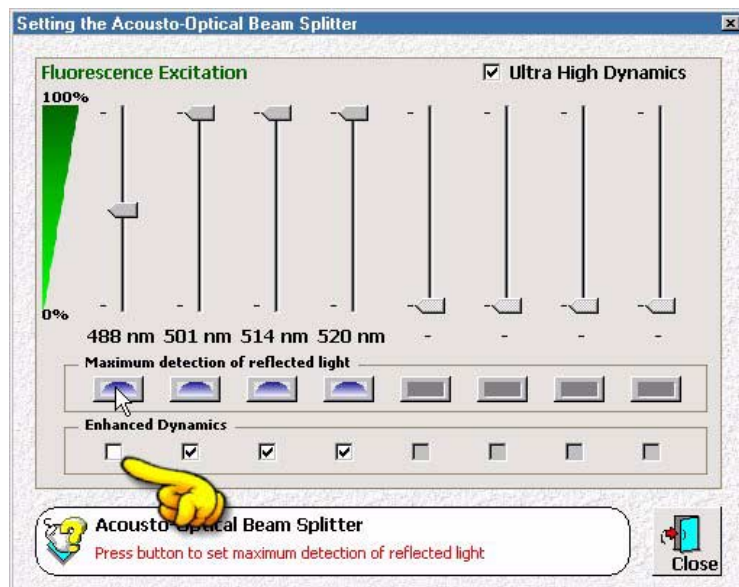
Il divisore acusto-ottico del fascio (in inglese: Acousto-Optical Beam Splitter) guida la luce di eccitazione del laser sul preparato e separa da quest'ultimo la luce fluorescente di ritorno e la luce di eccitazione riflessa. Nei microscopi confocali Leica, l'AOBS sostituisce ed ottimizza il filtro di eccitazione convenzionale, quale ad esempio la bi-dicroite o la tricroite.

L'AOBS è un cristallo ottico trasparente sul quale è applicato un campo di onde ultrasonore. La luce, che penetra il cristallo ottico, viene diffranta in base alla sua lunghezza d'onda e a quella del campo di onde ultrasonore. Attraverso la modulazione dell'ampiezza dell'ultrasuono, con l'AOBS non solo può essere selezionata una traccia laser, ma si può anche regolare la quantità di luce e il rapporto luce di eccitazione-luce di rilevamento del divisore del fascio per la traccia laser selezionata. Con l'AOBS si possono utilizzare in simultanea fino ad 8 lunghezze d'onda di eccitazione contemporaneamente.

Impiego dell'AOBS con riprese a fluorescenza

▶	L'impostazione standard per le riprese a fluorescenza prevede un massimo di 4 lunghezze d'onda di eccitazione. Subito dopo aver attivato una traccia laser con il cursore nella finestra di dialogo Beam Path Setting (Impostazione percorso del raggio), l'AOBS viene automaticamente impostato affinché la luce di eccitazione venga deviata al massimo verso il preparato. Per la luce fluorescente l'AOBS è trasparente, a prescindere dal cursore. Nella finestra di dialogo AOBS, il cursore è impostato al 100%. & vedi Impostare il percorso del raggio (pagina 140)
▶	Come impostazione standard, sono attivate entrambe le caselle di controllo Enhanced Dynamics (Dinamica avanzata) e Ultra-High Dynamics (Dinamica ultraelevata). Con questa doppia impostazione della dinamica si garantisce che la luce riflessa che rifluisce il percorso del raggio

	nella direzione inversa, venga allontanata dall'asse ottico e quindi non venga rilevata.

▶	Se si utilizzano più di 4 lunghezze d'onda di eccitazione, non è più possibile la doppia impostazione della dinamica per tutte le tracce laser. In questo caso, la dinamica avanzata (casella di spunta Enhanced Dynamics) si disattiva automaticamente per la traccia laser a onde più corte. Con qualsiasi altra lunghezza d'onda di eccitazione aggiuntiva, la dinamica avanzata viene disattivata per un'altra traccia laser.

Impiego dell'AOBS con riprese miste a riflessione/fluorescenza

▶	Per riprendere anche la luce riflessa, è in genere sufficiente variare il fattore di luce riflessa con il cursore.
▶	Se questo non bastasse, fare clic sul pulsante Maximum detection of reflected light (Rilevamento massimo di luce riflessa). Il relativo cursore viene automaticamente impostato al 50%, e la dinamica avanzata (casella di spunta Enhanced Dynamics) disattivata.
▶	Per riprese di luce di riflessione pura, è possibile aumentare al massimo il fattore di luce di riflessione per tutte le tracce laser disattivando anche la funzione Ultra-High Dynamics.

Selezionare un obiettivo

Funzione
Con il tasto Objective (obiettivo) si apre una lista di obiettivi dalla quale si può selezionare l'obiettivo più adatto per la propria acquisizione di immagini. In questa lista vengono mostrati solo gli obiettivi precedentemente attribuiti ad uno dei sette punti avvitabili massimi della torretta portaobiettivi. Questa attribuzione può essere eseguita come indicato di seguito:

▶	Nel menu Tools (Strumenti), scegliere l'opzione Objective (Obiettivo). Si apre una finestra di dialogo con un esteso elenco di obiettivi e i punti avvitabili (Slots) della torretta portaobiettivi rappresentati simbolicamente.
▶	Cercare l'obiettivo utilizzato all'interno della lista, e farvi clic sopra. Tenere premuto il tasto sinistro del mouse e tirare l'obiettivo sul simbolo dello slot in cui è avvitato.
▶	L'assegnazione si memorizza nel software e l'obiettivo compare nella lista di selezione, che può essere aperta con il tasto Objective.
▶	Ripetere questa procedura per tutti gli obiettivi inseriti nella torretta portaobiettivi.

Con i pulsanti Add (Aggiungi), Remove (Rimuovi) e Edit (Modifica) si possono inserire o cancellare obiettivi in questa finestra di dialogo, o anche modificarne le caratteristiche.

Nei microscopi del tipo DM RXA, DM RXE DM IRBE e DM IRBE2, la torretta portaobiettivi viene azionata dal software in modo tale che, durante la selezione di un obiettivo tramite il tasto o la finestra di dialogo Objective, questo venga automaticamente ruotato nel percorso del raggio. Per tutti gli altri tipi di microscopio, l'obiettivo non solo deve essere impostato nel software, ma anche portato manualmente nel percorso del raggio.

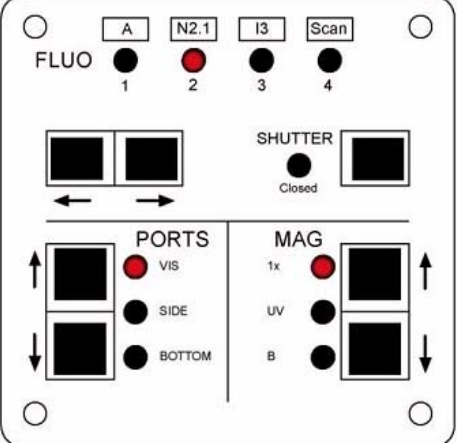
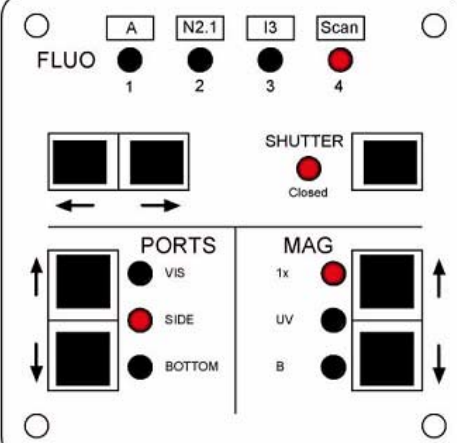
Integrazione
Nella scelta dell'obiettivo adatto ad una determinata applicazione, sono determinanti, oltre alla classe di correzione dell'obiettivo (acromatico, apocromatico, obiettivi alla fluorite e obiettivi piani), soprattutto il fattore di ingrandimento e l'apertura numerica. L'apertura numerica determina il potere risolvente di un obiettivo e viene calcolata dall'angolo di apertura del cono luminoso registrato dall'obiettivo e dall'indice di rifrazione dell'elemento tra lente dell'obiettivo e preparato: $NA = n \sin \alpha$

Obiettivi ad ingrandimento maggiore sono dotati in generale di aperture numeriche maggiori, ma anche di lenti di entrata più piccole, pertanto sono in grado di registrare luce soltanto da un campo di scansione relativamente minore. Gli obiettivi di apertura maggiore consentono sì una maggiore risoluzione, ma hanno anche lo svantaggio di tollerare solo una piccola distanza di lavoro libera. La seguente tabella illustra i rapporti:

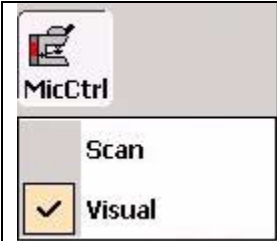
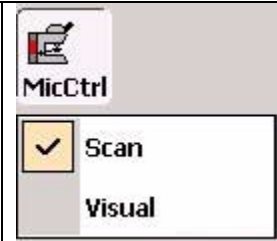
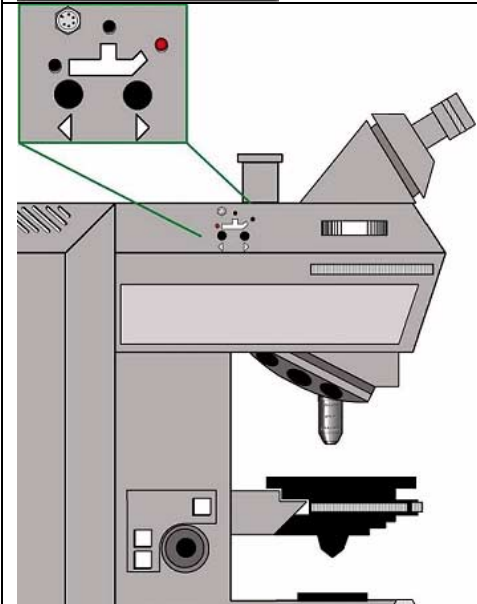
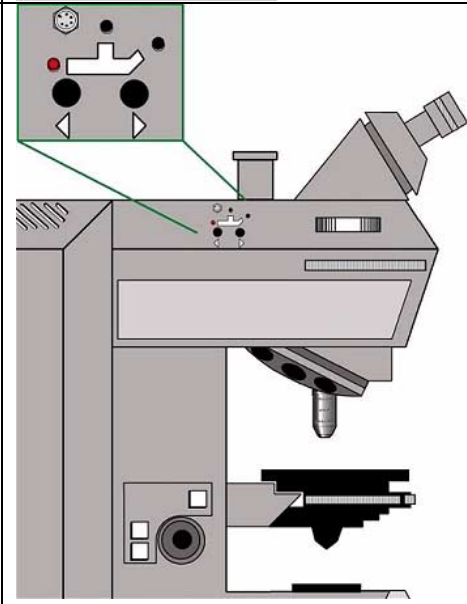
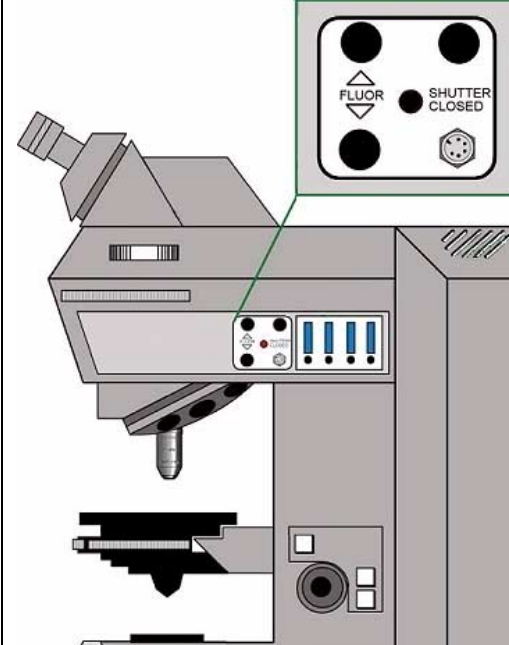
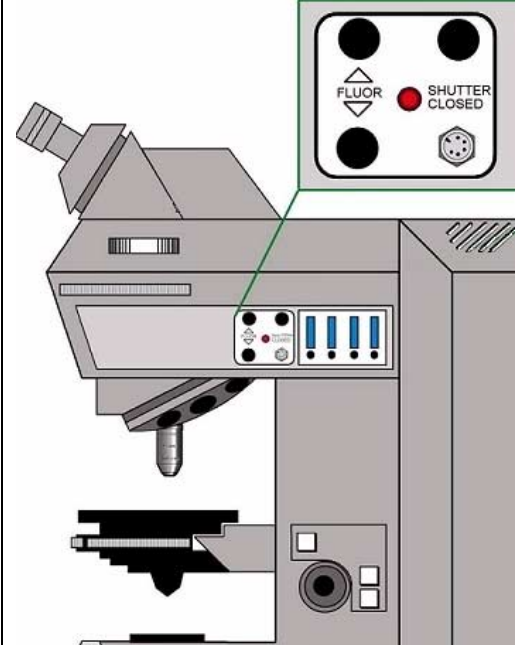
Obiettivo	Risoluzione (xy)	Risoluzione Aria (z)	Risoluzione Acqua (z)	Risoluzione Olio (z)	Grandezza campo di scansione (xy)
HC PL FLUOTAR 5x 0.15	1301	19410	25879	29559	3000
HC PL FLUOTAR 10x 0.30	651	4768	6407	7335	1500
N PLAN 20x 0.40	488	2630	3566	4093	750
N PLAN 50x 0.75	260	649	948	1108	300
PL APO 100x 1.40	139	319	209	236	150
	Valori in nm per una lunghezza d'onda di λ488 nm				Valori in m

Applicazioni tipiche
Gli obiettivi a secco vengono tipicamente utilizzati nella conoscenza dei materiali per l'analisi di strutture superficiali. Per la ripresa di strutture stratificate in cui gli strati di materiale si incontrano con indici di rifrazione diversi, si prestano al meglio gli obiettivi ad immersione. Per i preparati biologici, la scelta di un obiettivo ad immersione d'olio o di un obiettivo ad immersione d'acqua dipende dal preparato e dal suo elemento incorporato. La risoluzione migliore viene ottenuta quando gli indici di rifrazione dell'elemento incorporato, o preparato ed elemento obiettivo sono adattati l'uno all'altro.

Gestire i moduli dello stativo per microscopio dal software

In questa pagina vengono trattati i seguenti argomenti

Funzione del tasto Microscope Control
Questa funzione è disponibile solo per gli stativi per microscopio automatizzati DM RXA2 e DM IRE2. Con questa funzione, è possibile regolare più moduli degli stativi per microscopio DM RXA2 o DM IRE2 dal Leica Confocal Software facendo clic sulla modalità visiva o sulla modalità di scansione. Nella modalità visiva, il preparato viene esaminato attraverso gli oculari; nella modalità di scansione il preparato viene acquisito nel processo di scansione laser. I moduli, che vengono contemporaneamente azionati dal software, sono il tubo con le uscite fotografiche, il gruppo di filtri di fluorescenza e l'ottica tubolare.

Regolare i moduli dello stativo per microscopio DM IRE2

▶	Per regolare lo stativo del microscopio per l'analisi del preparato mediante oculari, fare clic sul tasto Microscope Control e scegliere l'opzione Visual (Visiva).
▶	Per regolare lo stativo del microscopio per la ripresa d'immagini nel processo di scansione laser, fare clic sul tasto Microscope Control e scegliere l'opzione Scan (Scansione).

	Pannello di controllo frontale dello stativo del microscopio DM IRE2		Pannello di controllo frontale dello stativo del microscopio DM IRE2
▶	La luce viene guidata verso l'uscita frontale (verso gli oculari). Il diodo VIS si illumina.	▶	La luce viene guidata verso l'uscita fotografica laterale. Il diodo SIDE si illumina.
▶	L'otturatore (Shutter) si apre: il diodo Shutter Closed (Otturatore chiuso) è spento.	▶	L'otturatore (Shutter) si chiude. Il diodo Shutter Closed (Otturatore chiuso) è acceso.
▶	Viene selezionato l'ultimo cubo filtrante memorizzato del modulo di fluorescenza. Le impostazioni del modulo di fluorescenza vengono salvate con il passaggio da modalità visiva a modalità di scansione.	▶	Viene impostata la posizione 4 (Scan (Scansione)) del modulo di fluorescenza. Nel display compare l'indicazione: — —.
▶	Viene selezionata l'ottica tubolare 1x. Il diodo MAG 1x si illumina.	▶	Viene selezionata l'ottica tubolare 1x. Il diodo MAG 1x si illumina. Con sistemi di microscopi UV, viene selezionata l'ottica UV. Il diodo MAG UV si illumina.

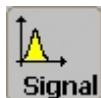
Con l'attivazione dello stativo per microscopio, viene impostata la modalità visiva o la modalità di scansione. Il percorso luminoso viene guidato verso l'uscita frontale mentre, per motivi di sicurezza, l'otturatore rimane chiuso. Uscire da questo «stato indefinito» selezionando ad esempio la modalità visiva con l'opzione Visual.

Regolare i moduli dello stativo per microscopio DM RXA2

▶	Per regolare lo stativo del microscopio per l'analisi del preparato mediante oculari, fare clic sul tasto Microscope Control (Controllo del microscopio)e scegliere l'opzione Visual (Visiva).
▶	Per regolare lo stativo del microscopio per la ripresa d'immagini nel processo di scansione laser, fare clic sul tasto Microscope Control e scegliere l'opzione Scan (Scansione).

Visual	Scan
▶ La luce viene guidata verso l'uscita frontale (verso gli oculari). Il diodo VIS si illumina.	▶ La luce viene guidata verso l'uscita fotografica posteriore. Il diodo REAR si illumina.
▶ L'otturatore (Shutter) si apre: il diodo Shutter Closed (Otturatore chiuso) è spento.	▶ L'otturatore (Shutter) si chiude. Il diodo Shutter Closed (Otturatore chiuso) è acceso.
▶ Viene selezionato l'ultimo cubo filtrante attivato del modulo di fluorescenza. Le impostazioni del modulo di fluorescenza vengono salvate con il passaggio da modalità visiva a modalità di scansione.	▶ Viene impostata la posizione 8 (Scan) del modulo di fluorescenza. Nel display compare l'indicazione: ——.
▶ Viene selezionata l'ottica tubolare 1x. Il diodo MAG 1x si illumina.	▶ Viene selezionata l'ottica tubolare 1x. Il diodo MAG 1x si illumina. Con sistemi di microscopi UV, viene selezionata l'ottica UV. Il diodo MAG UV si illumina.

Con l'attivazione dello stativo per microscopio, viene impostata la modalità visiva o la modalità di scansione. Il percorso luminoso viene guidato verso l'uscita frontale mentre, per motivi di sicurezza, l'otturatore rimane chiuso. Uscire da questo «stato indefinito» selezionando ad esempio la modalità visiva con l'opzione Visual.

Impostare i rivelatori

Funzione
Con il tasto Signal (Segnale) si apre una finestra di dialogo nella quale è possibile impostare i rivelatori affinché l'intero campo di valori delle intensità rilevate venga assegnato ad una tabella di classificazione cromatica e visualizzato nell'immagine. A questo scopo, per ogni rivelatore può essere impostato un valore Gain (Guadagno) e un valore Offset. Con il valore di Gain si modifica il guadagno del segnale rilevato, e quindi anche la luminosità e il contrasto dell'immagine, mentre con il valore di offset si determina un valore di soglia. Soltanto i segnali superiori a questo valore di soglia vengono rilevati e mostrati nell'immagine.

Ci sono due modi per regolare il valore Gain e il valore Offset:

▶	Con il puntatore, spostare il cursore sulla scala; il relativo valore viene indicato al di sotto della scala in questione.
▶	Fare doppio clic sul valore numerico indicato al di sotto della scala; si apre un'altra finestra di dialogo dove si può immettere il valore esatto.

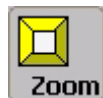
Per l'ottimizzazione dei valori di Gain e Offset sono più adatte le tabelle di classificazione cromatica *Glow Over* (intensità sopra), *Glow Under* (intensità sotto) e *Glow Over and Under* (intensità sopra e sotto).

& vedi Selezionare le tabelle di classificazione cromatica (LUT) (pagina 197)

Il valore Gain e il valore Offset dei rivelatori possono essere regolati anche con le relative manopole della console di comando.

& vedi Gestire funzioni tramite la console di comando (pagina 258)

Un rivelatore si attiva solo dopo aver fatto clic sulla relativa casella di spunta Active (Attivo) nella finestra di dialogo Signal (Segnale) oppure nella finestra di dialogo Beam Path Setting (Impostazione percorso del raggio).

Zoom elettronico

Funzione
Nella microscopia confocale, l'ingrandimento di un'immagine viene determinato, da un lato, dall'obiettivo, dall'altro, dallo zoom elettronico. L'obiettivo genera un'immagine intermedia il cui ingrandimento dipende dal fattore di ingrandimento dell'obiettivo. Un ulteriore ingrandimento può essere ottenuto con lo zoom elettronico. Con un fattore di zoomata equivalente a 1, la grandezza massima del campo di scansione viene acquisita con un determinato numero di punti. Quindi, impostando il fattore di zoomata 2, con lo stesso numero di punti viene acquisito un campo di scansione di metà lunghezza rispetto al campo di scansione massimo (1/4 del campo di scansione originale). Si ottiene quindi un maggiore ingrandimento e, con questo, anche una migliore risoluzione dell'immagine, in quanto viene acquisito un campo più piccolo con la stessa frequenza, ottenendo di conseguenza una densità di informazioni maggiori.

Nella finestra di dialogo che si apre con il tasto Zoom, è possibile selezionare uno dei fattori di zoomata preimpostati. Facendo clic sul pulsante Others (Altri), si può impostare un fattore di zoomata diverso, e in questi due modi:

▶	Spostando il cursore della scala con il puntatore; Il valore corrispondente viene mostrato al centro della finestra di dialogo.
▶	Fare doppio clic sul valore numerico indicato in grassetto al centro della finestra di dialogo. si apre un'altra finestra di dialogo dove si può immettere il valore esatto.

Il fattore di zoomata può essere regolato anche con l'apposita manopola della console di comando.

& vedi Gestire funzioni tramite la console di comando (pagina 258)

Integrazione
I fattori di zoomata impostabili vanno da 1 a 32. Ciononostante, con lo zoom elettronico non si può ingrandire in modo illimitato. Il limite viene raggiunto con la minore distanza otticamente ancora risolubile, determinata a sua volta dal potere risolvente dell'obiettivo. Secondo il teorema di Nyquist, questa distanza otticamente ancora risolubile viene acquisita senza perdita di informazioni nel momento in cui la scansione implica 2-3 punti raster circa. Se questa frequenza di scansione viene superata con un fattore di zoomata relativamente alto e un dato formato di scansione, un ulteriore ingrandimento si rivela insensato in quanto non possono più essere acquisiti altri dettagli ottici (ingrandimento a vuoto).

& vedi Selezionare un formato di scansione (pagina 152)
& vedi Selezionare un obiettivo (pagina 144)

Con preparati soggetti ad imbianchimento è consigliabile lavorare con lo zoom elettronico solo in misura limitata. Dato che con fattori di zoomata elevati un particolare del preparato viene ripreso con una frequenza di scansione relativamente più alta, il preparato risulta maggiormente esposto all'effetto luminoso. Questo può portare alla distruzione fotochimica del preparato (imbianchimento ottico).

Fattori di zoomata ottimali

La seguente tabella mostra con quali fattori di zoomata (contrassegnati in rosso) - in base ad una grandezza del campo di scansione legata all'obiettivo e ad un formato di scansione selezionato - il preparato viene acquisito senza perdita di informazioni:

Obiettivo			**Formato di scansione**	**Fattore di zoomata**	**Grandezza campo di scansione (µm)**	**Frequenza di scansione (nm)**	**Risoluzione/ frequenza di scansione**
Ingrandimento	**Apertura numerica**	**Risoluzione con λ 488 nm**					
20	0,6	325	1024 x 1024	1 2 4 **6**	750 375 187 125	732 366 183 122	0,4 0,8 1,8 **2,7**
			512 x 512	1 2 4 8 **10**	750 375 187 94 75	1465 732 365 183 146	0,2 0,4 0,9 1,8 **2,2**
			200 x 200	1 2 4 8 16 **32**	750 375 187 94 47 23	3750 1875 935 470 235 115	0,1 0,2 0,3 0,7 1,4 **2,8**
40	1,25	156	1024 x 1024	1 2 4 **6**	375 187 94 62	366 183 92 60	0,4 0,8 1,7 **2,6**
			512 x 512	1 2 4 8 **10**	375 187 94 47 37	732 365 183 92 72	0,2 0,4 0,8 1,7 **2,2**
			200 x 200	1 2 4 8 16 **32**	375 187 94 47 23 12	1875 935 470 235 115 60	0,1 0,2 0,3 0,7 1,3 **2,6**
100	1,4	139	1024 x 1024	1 2 **3**	150 75 50	146 73 49	0,9 1,9 **2,8**
			512 x 512	1 2 4 **6**	150 75 37 25	293 146 72 49	0,5 0,9 1,9 **2,8**
			200 x 200	1 2 4 8 **12**	150 75 37 18 12	750 375 185 90 60	0,2 0,4 0,7 1,5 **2,3**

Le dimensioni dei campi di scansione indicate valgono solamente per gli stativi microscopio DM Rxx e DM IRxx. Per la serie di microscopi DM LFxx i dati delle dimensioni dei campi di scansione vanno moltiplicati per il fattore 0,8. Il Leica Confocal Software dispone di tre funzioni zoom differenti fra loro: lo zoom elettronico, lo zoom tridimensionale e lo zoom grafico.

& vedi Zoomare un'immagine tridimensionale (pagina 215)

& vedi Finestra di dialogo Viewer Options, icona Display (pagina 187)

Ripresa ingrandita di un particolare dell'immagine

Funzione
La funzione Zoom In (Aumento zoom) consente la ripresa ingrandita di un particolare quadrangolare del preparato liberamente selezionabile.

▶	Fare clic sul tasto Zoom In. Viene contemporaneamente attivato il tasto Rectangle (Rettangolo). & vedi Definire un campo di analisi (ROI) come rettangolo (pagina 248)
▶	Definire il particolare da ingrandire tracciando un campo di analisi rettangolare (Region of interest o ROI) nell'immagine con il tasto Rectangle. & vedi Marcare e spostare un campo di analisi (ROI) (pagina 249)
▶	Con il tasto Select (seleziona), si può spostare il particolare sull'immagine.
▶	Iniziare l'acquisizione dell'immagine con il tasto Continuous Scan (Scansione continua), Series Scan (Scansione in serie) o Single Scan (Scansione singola).

Il software adatta automaticamente il particolare rettangolare selezionato all'effettiva forma quadrangolare che lo scanner può realizzare. La linea tratteggiata indica il particolare in questione.

Integrazione
L'acquisizione di un particolare grafico da ingrandire fornisce ulteriori dettagli solo nel momento in cui la distanza dei punti raster rimane maggiore della metà del potere risolvente ottico. Il potere risolvente, a sua volta, dipende dall'obiettivo utilizzato, dal formato di scansione impostato e dalla lunghezza dell'onda luminosa usata (ingrandimento a vuoto).

Applicazioni tipiche
Tutte le applicazioni che implicano la definizione ottica di strutture molto piccole e che non richiedono un'immagine d'insieme. Con l'acquisizione di tali preparati, occorre prestare attenzione ad usare anche un obiettivo con un potere risolvente ottico adeguatamente elevato per la ripresa.

Impostare il diaframma di rilevamento a foro

Funzione
Facendo clic sul tasto Pinhole (Foro stenopeico), si apre una finestra di dialogo dove si può impostare il diametro di apertura del diaframma di rilevamento a foro (del foro stenopeico di rilevamento). Nel campo di elenco in alto a destra, nella finestra di dialogo, si seleziona l'unità di visualizzazione del diametro. Si possono scegliere m, unità di Airy o valori digitali. Per immettere un valore di diametro del diaframma a foro esistono due possibilità:

▶	Con il puntatore, spostare il cursore sulla scala visualizzata a sinistra nella finestra di dialogo. Il valore corrispondente viene mostrato al centro della finestra di dialogo.
▶	Fare doppio clic sul valore numerico indicato in grassetto al centro della finestra di dialogo. si apre un'altra finestra di dialogo dove si può immettere il valore esatto.

Il diametro di apertura del diaframma di rilevamento a foro deve sempre essere regolato in base all'obiettivo che si utilizza. Facendo clic sul pulsante Airy 1, il diaframma di rilevamento a foro si regola automaticamente a seconda dell'obiettivo utilizzato al valore ottimale di 1 unità di Airy.

Oltre all'apertura numerica dell'obiettivo e alla lunghezza d'onda della luce, il diaframma di rilevamento a foro determina anche la densità delle sezioni ottiche.

Integrazione
Il diametro del diaframma a foro è regolato al livello ottimale quando coincide con il diametro del disco di Airy. Per disco di Airy si intende il cerchio luminoso interno dell'immagine di diffrazione di una sorgente luminosa puntiforme. Il diametro di questo disco di Airy dipende a sua volta da diversi parametri ottici, e per i sistemi confocali Leica può essere descritto nel seguente modo:

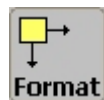
$$d_{Airy} = \frac{1{,}22 \cdot \lambda}{NA} \cdot M \cdot 3{,}5$$

Per calcolare il diametro del disco di Airy, serve quindi la lunghezza d'onda di eccitazione λ (per più lunghezze d'onda occorre prevedere un valore di media), l'apertura numerica NA e il fattore di ingrandimento M dell'obiettivo. Il fattore 3,6 indica l'ingrandimento di altre componenti ottiche del microscopio confocale Leica.

Se il diaframma a foro è impostato in base al disco di Airy, viene soppressa luce dall'esterno del piano focale e il rapporto segnale/disturbo è alto. In queste condizioni si possono riprendere sezioni ottiche di spessore minimo. Maggiore è l'apertura del diaframma a foro, maggiore è la quantità di luce che raggiunge il rivelatore. L'immagine si schiarisce. Qui, comunque, vengono riprodotti anche i contributi di strutture esterne al piano focale che rendono l'immagine sempre più sfocata.

Pertanto, si consiglia l'ingrandimento del diametro del diaframma oltre 1 unità di Airy soltanto se si devono rilevare segnali molto deboli.

Per riprese di preparati scientifici, nei rivelatori si riflette in genere abbastanza luce da poter chiudere completamente il foro stenopeico di rilevamento (quindi è possibile un'impostazione al diametro minimo).

Selezionare un formato di scansione

Funzione
Facendo clic sul tasto Format (Formato), si apre una finestra di dialogo con una serie di formati di scansione diversi. Con il formato di scansione si seleziona il raster grafico utilizzato per la ripresa. Per raster grafico si intende il numero di punti con cui il preparato viene sottoposto a scansione nelle tre direzioni spaziali. Oltre all'apertura numerica dell'obiettivo e alla lunghezza d'onda di eccitazione, il formato di scansione, unitamente allo zoom elettronico, determina in modo essenziale la definizione spaziale dei dati acquisiti.

Integrazione
Durante la selezione del formato di scansione, occorre considerare che tipi di rapporti esistano tra raster grafico e definizione dell'immagine creata. Secondo il teorema di Nyquist (detto anche Sampling Theorem), una struttura può essere acquisita senza perdita di informazioni solo se la più piccola distanza otticamente ancora risolubile viene acquisita con 2- 3 punti raster circa. Questa

distanza otticamente ancora risolubile, denominata **definizione laterale** dipende dall'apertura numerica dell'obiettivo e dalla lunghezza d'onda della luce di eccitazione utilizzata:

$$\text{Laterale Auflösung} = \frac{0{,}4 \cdot \lambda}{NA}$$

L'esempio seguente illustra questa relazione: si è ad esempio selezionato l'obiettivo PL APO 100x con apertura numerica NA = 1,4 e lunghezza d'onda di λ = 488 nm. Si ottiene quindi la più piccola distanza otticamente ancora risolubile:

$$\frac{0{,}4 \cdot 488}{1{,}4} = \text{ca. } 140 \text{ nm}$$

In base alla precedente formula empirica, la distanza dei punti raster necessaria per una ripresa senza perdita di informazioni equivale a:

$$\frac{140 \text{ nm}}{3} = \text{ca. } 47 \text{ nm}$$

Se si è selezionato un formato di scansione 1024x1024, e si ha un obiettivo PL APO 100x, il cui campo di scansione massimo misura
150 µm, si ottiene comunque questa distanza di punti raster:

$$\frac{150\ \mu m}{1024} = \text{ca. } 146 \text{ nm}$$

Per ottenere la distanza raster di 47 nm necessaria, si può quindi, alternativamente, aumentare il formato di scansione (per esempio, a 2048x2048) o ridurre la grandezza del campo di scansione mediante lo zoom elettronico (Zoom=2).

La distanza raster attuale viene visualizzata nella legenda Hardware. Questo valore è definito Voxel Size (dimensione voxel) e viene nuovamente calcolato appena cambia il formato di scansione, lo zoom elettronico o l'obiettivo.

& vedi Zoom elettronico (pagina 149)
& vedi Selezionare un obiettivo (pagina 144)

Si parla di Oversampling (Sovracampionamento) quando la frequenza di scansione di 2-3 punti viene superata: in questo caso, la struttura viene perfettamente riprodotta, senza però avere un'aggiunta di ulteriori informazioni. Lo svantaggio dell'oversampling è rappresentato dal tempo di scansione prolungato e, per preparati soggetti ad imbianchimento, dal pericolo di distruzione dell'oggetto in esame. Si parla di Undersampling (Sottocampionamento) quando la frequenza di scansione di 2-3 punti non viene raggiunta: in questo caso, può essere che non tutte le informazioni necessarie vengano acquisite. Probabilmente l'immagine mostrerà strutture che non figurano nel preparato. Questo effetto è noto come Aliasing.

Selezionare una modalità di scansione

Funzione

Facendo clic sul tasto Mode (Modalità), si apre una finestra di dialogo con una lista delle modalità di scansione disponibili. La modalità di scansione determina i piani ottici nel preparato da sottoporre a scansione. In linea di principio, si possono acquisire sezioni xy orizzontali o sezioni xz verticali. Per

creare un'immagine tridimensionale dal preparato, le sezioni ottiche vengono continuate nella terza direzione spaziale specifica, registrando così una pila di fotogrammi. Inoltre, c'è la possibilità di eseguire la registrazione in base al tempo o alla lunghezza d'onda:

Modalità	Funzione
xyz	Dalle sezioni xy viene acquisita una pila d'immagini nella direzione z.
xzy	Dalle sezioni xz viene acquisita una pila d'immagini nella direzione y.
xt	Una riga viene acquisita più volte di seguito.
xyt	Una sezione xy viene acquisita più volte di seguito.
xzt	Una sezione xz viene acquisita più volte di seguito.
xyzt	Dalle sezioni xy, viene acquisita una pila d'immagini nella direzione z più volte di seguito.
xyλ	Una sezione xy viene acquisita a lunghezze d'onda diverse.
xzλ	Una sezione xz viene acquisita a lunghezze d'onda diverse.

Tutte le modalità di scansione (tranne xt) si compongono di almeno tre dimensioni. Se si acquisiscono immagini solo da un piano ottico (xy o xz) con la funzione di scansione continua o con la funzione di scansione passo passo, la terza e le altre dimensioni vengono ignorate dallo strumento.

*Le modalità di scansione xzy e xzt vengono visualizzate nella lista solo se prima è stato selezionato il punto di selezione Galvo con il tasto Z-Scan. Similmente, le modalità di scansione per una serie lambda xy λe xzλvengono mostrate solo se nella finestra di dialogo Beam Path Setting (impostazione percorso del raggio) è attivo solo **un** rivelatore.*

& vedi Impostare il percorso del raggio (pagina 140)

Selezionare una velocità di scansione

Funzione
Facendo clic sul tasto Speed (velocità), si apre una finestra di dialogo in cui si possono impostare quattro diverse velocità di scansione.

Velocità	
200	Righe di visualizzazione al secondo
400	Righe di visualizzazione al secondo
800	Righe di visualizzazione al secondo
1000	Righe di visualizzazione al secondo

In combinazione con la scansione bidirezionale, la velocità della registrazione di dati può essere ancora aumentata.

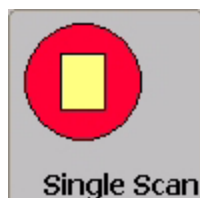
& vedi Scansione unidirezionale o bidirezionale (pagina 171)

Integrazione
Maggiore è la velocità di scansione impostata, minore è il tempo di permanenza del punto laser. A questo proposito occorre considerare anche il formato di scansione, quindi il numero di punti di scansione in una riga. Maggiore è il formato di scansione alla medesima velocità, più breve è il tempo

di permanenza del punto laser su un punto di scansione.

Più a lungo permane il punto luminoso del raggio laser sui singoli punti di scansione del preparato, maggiore è la quantità di luce rilevata dal rivelatore. Con una velocità di scansione minore, si può quindi ottenere un migliore rapporto segnale/disturbo. Lo svantaggio di una minore velocità di scansione è legato al fatto che il preparato viene imbianchito dall'effetto più prolungato della luce, e può quindi diventare inutilizzabile. Questo vale in modo particolare per le applicazioni di fluorescenza.

Per motivi tecnici specifici dello strumento, impostando i gradi di velocità 800 o 1000, può non essere più possibile acquisire il campo di scansione massimo.Il sistema si inserisce automaticamente al fattore di zoomata 2 o al fattore di zoomata 4.

Avviare una scansione passo passo

Funzione
Con il tasto Single Scan (Scansione singola), viene ripresa una sola immagine da un unico piano ottico del preparato.

Prima di acquisire un'immagine con la funzione di scansione passo passo, devono prima essere impostati tutti i parametri di scansione necessari per una qualità d'immagine ottimale con la funzione di scansione continua.

& vedi Avviare una scansione continua (pagina 155)

Applicazioni tipiche
La funzione di scansione passo passo è studiata per la ripresa di preparati soggetti ad imbianchimento. Con tali preparati questa funzione va utilizzata non solo per la ripresa, ma anche al posto della funzione di scansione continua per inizializzare i parametri di scansione. Quando si zooma il campo di scansione, la funzione di scansione passo passo è adatta anche per controllare il particolare dell'immagine.

Avviare una scansione continua

Funzione
Con il tasto Continuous Scan (scansione continua), si acquisiscono immagini dal preparato in modo continuo e sempre soltanto da un unico piano ottico. In questo caso non è possibile generare serie di immagini poiché l'ultima immagine creata sostituisce sempre quella precedente.

Premere di nuovo su questo tasto per terminare la scansione continua.

Integrazione
L'apparecchio lavora automaticamente con gli ultimi parametri di scansione impostati. Alcuni di questi parametri possono essere modificati **durante** la ripresa dell'immagine. Altri, invece, devono essere impostati **prima** a di iniziare la ripresa:

Prima della ripresa	Durante la ripresa
Selezionare un obiettivo Selezionare un formato di scansione Selezionare una modalità di scansione Selezionare una velocità di scansione Selezionare una scansione unidirezionale o bidirezionale	Impostare il percorso del raggio Impostare il diaframma di rilevamento a foro Impostare lo zoom elettronico Impostare i rivelatori Impostare una fase

I tasti delle funzioni che non possono essere impostate durante la ripresa con la funzione di scansione continua vengono disattivati e visualizzati con una base grigia.

Applicazioni tipiche
La funzione di scansione continua serve ad ottimizzare la qualità dell'immagine durante la prima ripresa di un preparato. Mentre il preparato continua ad essere acquisito, è possibile impostare i parametri di scansione indicati sopra e controllare il risultato direttamente sull'immagine.

Con preparati soggetti ad imbianchimento è consigliabile lavorare con la scansione continua solo in misura limitata. Il continuo effetto luminoso del laser può distruggere fotochimicamente il preparato (imbianchimento ottico) e renderlo quindi inutilizzabile.

Finestra di dialogo Series Scan Overview

Funzione
In questa finestra di dialogo, è possibile definire il punto iniziale e il punto finale di una serie d'immagini seguendo contemporaneamente la ripresa delle singole sezioni. L'area di scansione tridimensionale viene rappresentata graficamente come un cubo. In questo schema, un quadrato giallo rappresenta l'attuale posizione z e y, un quadrato verde il punto iniziale, un quadrato rosso il punto finale. I valori di posizione corrispondenti vengono indicati a destra, accanto alla grafica. Il punto iniziale e il punto finale vanno impostati come illustrato di seguito.

▶	Con la freccia del mouse, spostare il quadrato giallo fino al livello in cui dovrebbe iniziare la serie di immagini.
▶	Fare clic nella casella bianca relativa al punto iniziale (Begin). Il valore di posizione corrispondente viene mostrato e salvato.
▶	Con la freccia del mouse, spostare il quadrato giallo fino al livello in cui dovrebbe terminare la serie di immagini.
▶	Fare clic nella casella bianca relativa al punto finale (End). Il valore di posizione corrispondente viene mostrato e salvato.
▶	L'altezza complessiva della pila di immagini compresa tra punto iniziale e punto finale viene calcolata e visualizzata (Total).

A questo punto, fare clic sul pulsante Series Scan (Scansione in serie). La finestra di dialogo rimane

aperta e si può seguire contemporaneamente la ripresa della serie di immagini.

Punto iniziale e punto finale possono essere definiti anche con la console di comando e i tasti separati Begin (Inizio) e End (Fine).

- vedi Definire il punto iniziale di una serie spaziale (pagina 157)
- vedi Definire il punto finale di una serie spaziale (pagina 158)

Integrazione
Nella finestra di dialogo Series Scan Overview (panoramica scansione in serie) vengono indicati anche questi ulteriori parametri da impostare prima della ripresa di una serie di immagini:

▶	Scanmodus (modalità di scansione; riga più in alto a destra, accanto allo schema)
▶	Scanformat (formato di scansione; numeri rossi sullo spigolo superiore del cubo)
▶	Numero delle sezioni ottiche (graduazioni tra punto iniziale e punto finale)

Il numero rosso sullo spigolo verticale del cubo corrisponde alla corsa massima dell'attuatore z, che non può essere modificata.

- vedi Selezionare una modalità di scansione (pagina 153)
- vedi Selezionare un formato di scansione (pagina 152)
- vedi Determinare il numero di sezioni spaziali (pagina 159)

Definire il punto iniziale di una serie spaziale

Funzione
Con il tasto Begin (Inizio) si definisce il punto iniziale di una serie di immagini spaziali. Impostare anzitutto l'esatta posizione z e y nella finestra di dialogo Series Scan Overview (Panoramica scansione in serie) oppure sulla console di comando con l'apposita manopola. Poi fare clic sul tasto Begin. Il valore di posizione per il punto iniziale viene salvato. Allo stesso modo si imposta anche il punto finale.

- vedi Finestra di dialogo Series Scan Overview (pagina 156)
- vedi Gestire funzioni tramite la console di comando (pagina 258)

Definire il punto iniziale di una serie lambda

Funzione
Con una serie lambda, viene ripresa da un unico piano ottico una serie di fotogrammi, rilevati ogni volta ad una determinata lunghezza d'onda. Con il tasto Lambda Scan Begin (Inizio scansione lambda) si definisce la lunghezza d'onda alla quale deve iniziare la ripresa dell'immagine.

Il tasto Lambda Scan Begin si attiva solo selezionando una modalità di scansione con la dimensione di lunghezza d'onda tramite il tasto Mode.

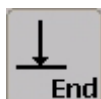
& vedi Selezionare una modalità di scansione (pagina 153)

▶	Con il tasto Beam (Raggio), aprire la finestra di dialogo Beam Path Setting (Impostazione percorso del raggio).
▶	Attivare un rivelatore facendo clic sulla relativa casella di spunta. Un'ombra di proiezione collega ora il rivelatore attivato con il relativo cursore sulla scala dello spettro.
▶	Fare doppio clic su questo cursore. Si apre la finestra di dialogo Range Properties (Gamma proprietà), dove è possibile impostare l'ampiezza di banda di rilevamento.
▶	Portare il cursore sulla scala dello spettro alla posizione iniziale desiderata. Il margine sinistro del cursore contrassegna la lunghezza d'onda alla quale deve cominciare la ripresa d'immagine.
▶	Fare clic sul tasto Lambda Scan Begin per salvare il valore.

Allo stesso modo si determina il punto finale di una serie lambda. Inoltre si deve definire anche il numero degli intervalli di lunghezze d'onda.

& vedi Definire il punto finale di una serie lambda (pagina 159)
& vedi Definire il numero di intervalli delle lunghezze d'onda (pagina 160)

Applicazioni tipiche
Con una serie lambda si può determinare il picco di emissione di un colorante fluorescente. Questo è importante in quanto lo spostamento di Stokes della curva di emissioni di un colorante fluorescente dipende dal preparato utilizzato di volta in volta. In questo modo si può impostare esattamente il campo di rilevamento per una specifica applicazione.

Definire il punto finale di una serie spaziale

Funzione
Con il tasto End (Fine) si definisce il punto finale di una serie di immagini spaziali. Impostare anzitutto l'esatta posizione z e y nella finestra di dialogo Series Scan Overview (Panoramica scansione in serie) oppure sulla console di comando con l'apposita manopola. Poi fare clic sul tasto End. Il valore di posizione per il punto finale viene salvato. Allo stesso modo si imposta anche il punto iniziale.

& vedi Finestra di dialogo Series Scan Overview (pagina 142)
& vedi Gestire funzioni tramite la console di comando (pagina 258)

Definire il punto finale di una serie lambda

Funzione
Con una serie lambda, viene ripresa da un unico piano ottico una serie di fotogrammi, rilevati ogni volta ad una determinata lunghezza d'onda. Con il tasto Lambda Scan End (Fine scansione lambda) si definisce la lunghezza d'onda alla quale deve terminare la ripresa.

Il tasto Lambda Scan End si attiva solo dopo aver selezionato una modalità di scansione con la dimensione di lunghezza d'onda tramite il tasto Mode.

& vedi Selezionare una modalità di scansione (pagina 153)

▶	Con il tasto Beam (raggio), aprire la finestra di dialogo Beam Path Setting (impostazione percorso del raggio).
▶	Attivare un rivelatore facendo clic sulla relativa casella di spunta. Un'ombra di proiezione collega ora il rivelatore attivato con il relativo cursore sulla scala dello spettro.
▶	Fare doppio clic su questo cursore. Si apre la finestra di dialogo Range Properties (gamma proprietà), dove è possibile impostare l'ampiezza di banda di rilevamento.
▶	Portare il cursore sulla scala dello spettro alla posizione finale desiderata. Il margine destro del cursore contrassegna la lunghezza d'onda alla quale dovrebbe terminare la ripresa.
▶	Fare clic sul tasto Lambda Scan End per salvare il valore.

Allo stesso modo si determina il punto iniziale di una serie lambda. Inoltre si deve definire anche il numero degli intervalli di lunghezze d'onda.

& vedi Definire il punto iniziale di una serie lambda (pagina 157)
& vedi Definire il numero di intervalli delle lunghezze d'onda (pagina 160)

Applicazioni tipiche
Con una serie lambda si può determinare il picco di emissione di un colorante fluorescente. Questo è importante in quanto lo spostamento di Stokes della curva di emissioni di un colorante fluorescente dipende dal preparato utilizzato di volta in volta. In questo modo si può impostare esattamente il campo di rilevamento per una specifica applicazione.

Determinare il numero di sezioni spaziali

Funzione
Facendo clic sul tasto Sections (Sezioni), si apre una finestra di dialogo dove si può selezionare il numero delle sezioni xy orizzontali o xz verticali per la ripresa di una serie di immagini. Per selezionare un numero di sezioni diverso da quelli presenti in elenco, fare clic sul punto di selezione Others (altri) e compare la finestra di dialogo Z/Y-Configuration (configurazione Z/Y) con i dati seguenti:

Parametro	Descrizione
Image Dim. z/y (µm)	Altezza dell'intera pila di immagini compresa tra il punto iniziale e il punto finale della serie

# Sections	Numero delle sezioni impostate
Step Size (µm)	Ampiezza dell'intervallo, quindi la distanza tra due sezioni

In questa finestra di dialogo si può immettere un valore a scelta per il numero di sezioni e l'ampiezza di intervallo. L'altezza della pila di immagini non può essere modificata perché questo parametro è determinato dal punto iniziale e finale della serie di immagini. Dato che l'ampiezza dell'intervallo deve sempre essere un multiplo dell'intervallo minimo dell'attuatore z, determinate combinazioni di valori sono possibili solo conformando l'altezza della pila di immagini o il numero di sezioni. A seconda di quale dei due pulsanti Calculate (Calcola) viene azionato con un clic, uno dei due parametri rimane immutato.

Per calcolare il numero di sezioni con la priorità di mantenere possibilmente invariata l'altezza della pila di immagini:

▶	Immettere l'ampiezza di intervallo desiderata nel campo Step Size (Ampiezza intervallo).
▶	Fare quindi clic sul pulsante Calculate (Calcola) accanto al campo Step Size.

Per calcolare il numero di sezioni con la priorità di mantenere possibilmente invariato il numero di sezioni:

▶	Immettere l'ampiezza di intervallo desiderata nel campo Step Size.
▶	Fare quindi clic sul pulsante Calculate accanto al campo # Sections (Sezioni).

Per calcolare l'ampiezza di intervallo con la priorità di mantenere possibilmente invariata l'altezza della pila:

▶	Immettere il numero di sezioni desiderate (Solo numeri interi) nel campo # Sections.
▶	Fare quindi clic sul pulsante Calculate accanto al campo # Sections.

Per calcolare l'ampiezza di intervallo con la priorità di mantenere possibilmente invariato il numero di sezioni:

▶	Immettere il numero di sezioni desiderate (solo numeri interi) nel campo # Sections (sezioni).
▶	Fare quindi clic sul pulsante Calculate (calcola) accanto al campo Step Size.

Facendo clic sul tasto Reset (Ripristina) vengono visualizzati gli ultimi valori salvati.

& vedi Avviare una scansione in serie (pagina 164)
& vedi Finestra di dialogo Series Scan Overview (pagina 156)

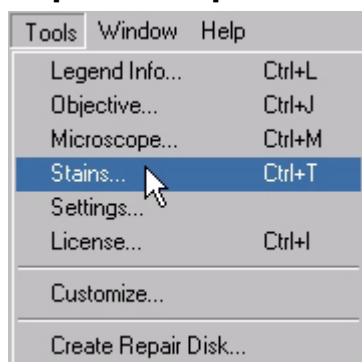
Definire il numero di intervalli delle lunghezze d'onda

Funzione
Con una serie lambda, viene ripresa da un unico piano ottico una serie di fotogrammi, rilevati ogni volta ad una determinata lunghezza d'onda. La ripresa dell'immagine avviene attraverso un campo di lunghezze d'onda, delimitato dal punto iniziale e dal punto finale della serie. Con il tasto Lambda Steps (Intervalli lambda) si definisce il numero di riprese da effettuare all'interno di questo campo.

Il tasto Lambda Steps si attiva solo dopo aver selezionato una modalità di scansione con la dimensione di lunghezza d'onda tramite il tasto Mode (Modalità).

& vedi Selezionare una modalità di scansione (pagina 152)
& vedi Definire il punto iniziale di una serie lambda (pagina 157)
& vedi Definire il punto finale di una serie lambda (pagina 159)

Applicazioni tipiche
Con una serie lambda si può determinare il picco di emissione di un colorante fluorescente. Questo è importante in quanto lo spostamento di Stokes della curva di emissioni di un colorante fluorescente dipende dal preparato utilizzato di volta in volta. In questo modo si può impostare esattamente il campo di rilevamento per una specifica applicazione.

Importare spettri di colorante

In questa pagina vengono trattati i seguenti argomenti

- Importare spettri di colorante da un file di testo
- Rilevare spettri di colorante con l'LCS ed importarli con Excel

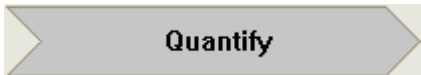
Gli spettri di emissione dei coloranti di fluorescenza più utilizzati sono disponibili nel Leica Confocal Software (LCS), dove però possono solo essere letti, e non modificati dall'utente. Con l'Editor di coloranti è possibile importare, salvare ed elaborare in qualsiasi momento i dati di uno spettro di colorante fluorescente da un file di testo esterno, p. es. da un file ASCII o da un file Excel.

Importare spettri di colorante da un file di testo

(1) Lunghezza d'onda (unità disponibile in nm o m) *(2) Altezza del segnale di fluorescenza* *(3) Arresti di tabulazione che fungono da separatore*	
Dati dello spettro di emissione di Calcium Crimson	*Finestra di dialogo Stain Editor*

- ▶ Collocare i dati dello spettro di colorante che si desidera importare in un editor di testi a scelta.
- ▶ Accertarsi di aver diviso i valori della lunghezza d'onda nella colonna a sinistra (1) dai valori delle emissioni della colonna a destra (2) con gli arresti di tabulazione (3).
- ▶ Selezionare le due colonne e copiarle nel clipboard con i tasti Ctrl e C della tastiera.
- ▶ Aprire la finestra di dialogo Stain Editor (Editor di coloranti) del Leica Confocal Software selezionando Tools/ Stains (Strumenti, Coloranti).
- ▶ Fare clic sul pulsante Add (Aggiungi), immettere il nome del colorante di fluorescenza e fare clic su OK.
- ▶ Nella finestra di dialogo Stain Editor, fare clic nella prima cella della colonna che riporta l'indicazione Wavelength (Lunghezza d'onda).
- ▶ Con i tasti Ctrl e V della tastiera, trasferire i dati copiati dal clipboard all'Editor di coloranti.

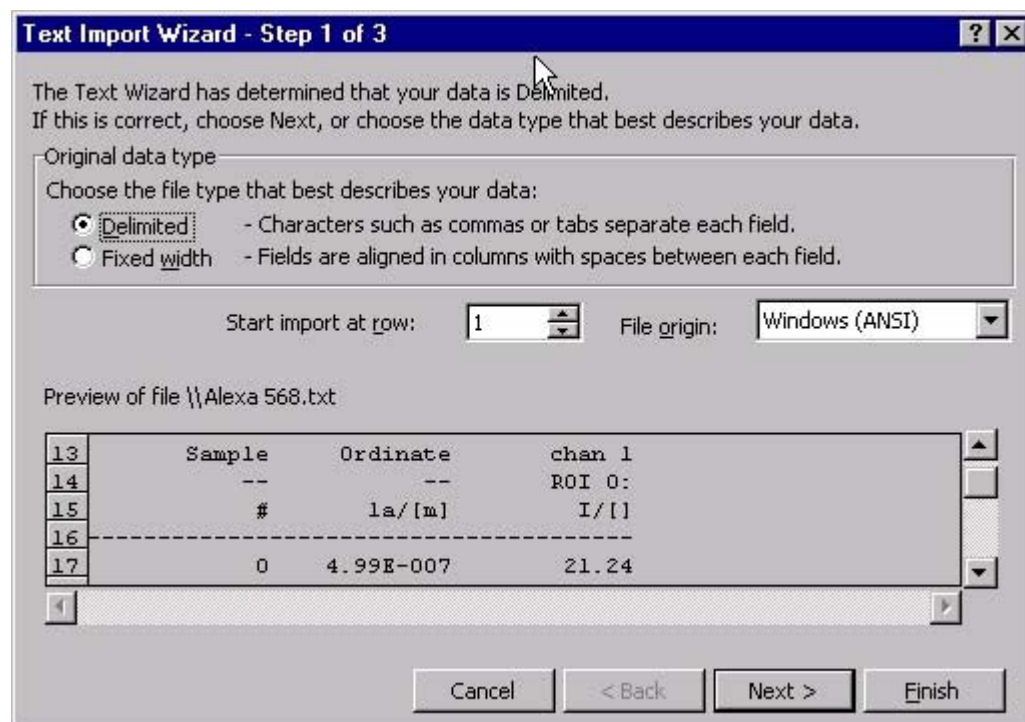
Nell'Editor di coloranti, i dati dello spettro di emissione vengono standardizzati ad un campo di valori compreso tra 0 e 1 e visualizzati ad intervalli di 10 nm. Le curve delle emissioni servono per l'impostazione dell'ampiezza della banda di rilevamento nella finestra di dialogo Beam Path Setting (Impostazione percorso del raggio). Quando la finestra di dialogo Beam Path Setting viene successivamente aperta, la curva di emissione del nuovo colorante di fluorescenza può essere selezionata e visualizzata nello spettro. I dati delle curve di emissione vengono anche utilizzati per correggere i dati relativi alla diafonia tra i canali di rilevamento.

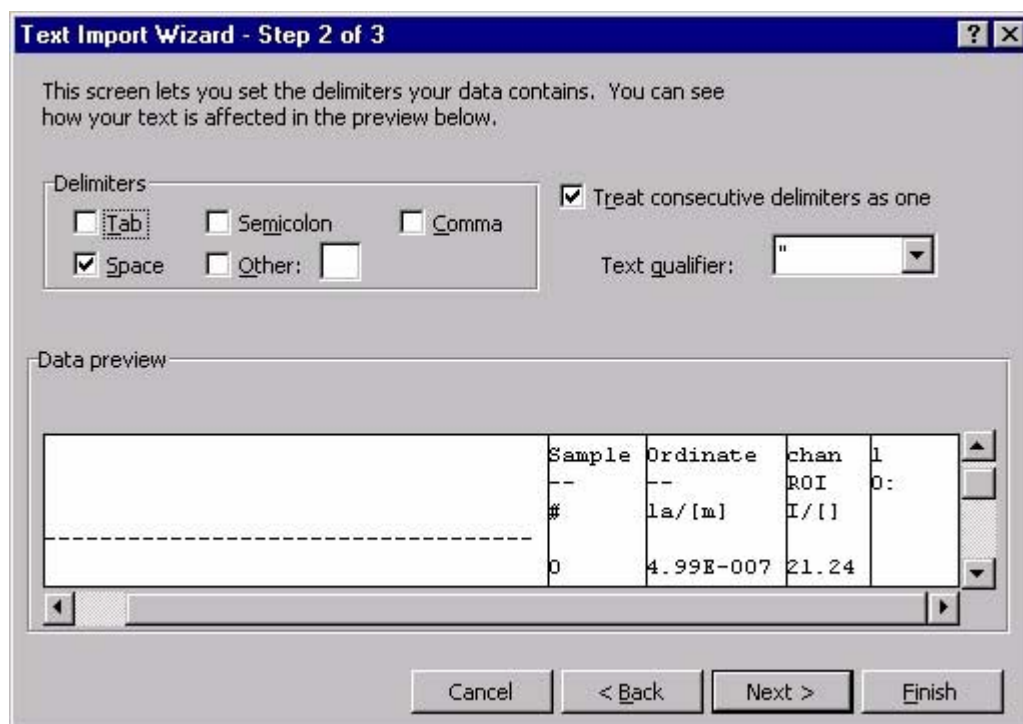
& vedi Impostare il percorso del raggio (pagina 140)
& vedi Fase operativa Process / cartella Dye Finder (pagina **Error! Bookmark not defined.**)

I dati vengono importati correttamente nell'Editor di coloranti solo se è stato selezionato

il punto come separatore decimale. Questa impostazione deve essere effettuata in Windows/ Pannello di controllo/Impostazioni internazionali.

Rilevare spettri di colorante con l'LCS ed importarli con Excel
Nel Leica Confocal Software, l'utente ha la possibilità di rilevare direttamente lo spettro di emissione di un colorante di fluorescenza acquisendo una serie di scansione di un preparato tinto con il relativo colorante di fluorescenza. Nella guida in linea (Help (Supporto)/ Tutorials (Esercitazioni)/ Acquisire una serie di scansione) si trova una descrizione dettagliata per la creazione di una serie di scansione. Dopo aver creato una serie di scansione, procedere come indicato:

▶	Fare clic sul simbolo di freccia Quantify (Quantifica) e poi sul tasto Profile Z (Profilo Z). Si apre la finestra di dialogo Profile through Stack (Profilo da pila). Quantify Pr. (z)
▶	Fare clic su uno dei tasti ROI (Region of interest = campo di analisi), per esempio il tasto Rectangle (Rettangolo), e disegnare un campo di analisi nell'immagine all'interno della finestra di visualizzazione Viewer. Nella finestra di dialogo, compare un diagramma con i grafi dello spettro di fluorescenza. Rect
▶	Mantenere il puntatore del mouse sul diagramma ed aprire il menu contestuale azionando il tasto destro del mouse.
▶	Selezionare Export (Esporta) nel menu contestuale per esportare i dati di analisi come file di testo ASCII.

I dati dello spettro di emissione possono essere trasferiti in Microsoft Excel nel formato di colonna necessario.

▶	In Microsoft Excel, aprire il file di testo (ASCII o ANSI) con i dati dello spettro di emissione. Si apre automaticamente la guida all'importazione di testi (Text Import Wizard).

▶	Nel campo Original Data Type (Tipo dati originali) fare clic sull'opzione Delimited (Delimitati) e poi sul pulsante Next (Successivo).

▶	Nel campo, selezionare il separatore con cui separare i dati, in questo caso Space (Spazio).
▶	Nella finestra di anteprima è possibile verificare se i dati vengono separati correttamente.
▶	Fare clic su Finish (Termina) per aprire i dati in Excel.
▶	Selezionare entrambe le colonne e copiarle nell'Editor di coloranti del Leica Confocal Software, come descritto in precedenza.

Avviare una scansione in serie

Funzione
Con il tasto Series Scan (Scansione in serie) si crea una serie di immagini, ossia un record di dati immagine pluridimensionale del preparato. Le dimensioni disponibili per la ripresa di una serie immagini sono, oltre alle tre direzioni spaziali (x, y, z), anche le dimensioni Tempo (t) e Lunghezza d'onda (λ). In questo modo, la registrazione di una pila di immagini spaziali tridimensionali dalle sezioni xy o xz può essere eseguita anche in base al tempo o alla lunghezza d'onda.

Prima di acquisire una serie di immagini, si devono impostare tutti i parametri di scansione necessari per una qualità d'immagine ottimale con la funzione di scansione continua (tasto Continuous Scan).

& vedi Avviare una scansione continua (pagina 155)

Per la registrazione di una serie di immagini spaziali si devono effettuare le seguenti impostazioni:

▶	Selezionare la modalità di scansione con il tasto Mode (Modalità). & vedi Selezionare una modalità di scansione (pagina 153)
▶	Selezionare il formato di scansione con il tasto Format (Formato). & vedi Selezionare un formato di scansione (pagina 152)
▶	Impostare la posizione z o la posizione y desiderata nella finestra di dialogo Series Scan Overview, oppure con la relativa manopola della console di comando. & vedi Finestra di dialogo Series Scan Overview (pagina 156) & vedi Gestire funzioni tramite la console di comando (pagina 258)
▶	Salvare il punto iniziale della serie di immagini con il tasto Begin (Inizio) o nella finestra di dialogo Series Scan Overview. & vedi Definire il punto iniziale di una serie spaziale (pagina 157)
▶	Impostare la posizione z o la posizione y desiderata nella finestra di dialogo Series Scan Overview, oppure con la relativa manopola della console di comando. & vedi Finestra di dialogo Series Scan Overview (pagina 156) & vedi Gestire funzioni tramite la console di comando (pagina 258)
▶	Salvare il punto finale della serie di immagini con il tasto End (Fine) o nella finestra di dialogo Series Scan Overview. & vedi Definire il punto finale di una serie spaziale (pagina 158)
▶	Selezionare il numero di sezioni spaziali con il tasto Sections (Sezioni). & vedi Determinare il numero di sezioni spaziali (pagina 159)

Dopo aver effettuato queste impostazioni, fare clic sul tasto Series Scan Scansione in serie).
Nella finestra di dialogo Series Scan Overview si può seguire il corso della registrazione della pila di immagini.

Per la registrazione di una serie temporale si devono effettuare le seguenti impostazioni:

▶	Selezionare una modalità di scansione con dimensione temporale tramite il tasto Mode. & vedi Selezionare una modalità di scansione (pagina 153)
▶	Selezionare il formato di scansione con il tasto Format. & vedi Selezionare un formato di scansione (pagina 152)
▶	Impostare la posizione z o la posizione y desiderata nella finestra di dialogo Series Scan Overview, oppure con la relativa manopola della console di comando. & vedi Finestra di dialogo Series Scan Overview (pagina 156) & vedi Gestire funzioni tramite la console di comando (pagina 258)
▶	Impostare il numero di riprese, l'intervallo di pausa tra le riprese e la durata dell'elaborazione. & vedi Impostare una serie temporale (pagina **Error! Bookmark not defined.**)

Per la registrazione di una serie lambda si devono effettuare le seguenti impostazioni:

▶	Selezionare una modalità di scansione con la dimensione di lunghezza d'onda tramite il tasto Mode. & vedi Selezionare una modalità di scansione (pagina 153)
▶	Selezionare il formato di scansione con il tasto Format. & vedi Selezionare un formato di scansione (pagina 152)
▶	Stabilire la lunghezza d'onda in cui deve iniziare la serie lambda. & vedi Definire il punto iniziale di una serie lambda (pagina 157)
▶	Stabilire la lunghezza d'onda in cui deve terminare la serie lambda. & vedi Definire il punto finale di una serie lambda (pagina 159)
▶	Selezionare il numero desiderato di riprese tra punto iniziale e punto finale della serie lambda. & vedi Definire il numero di intervalli delle lunghezze d'onda (pagina 160)

Dopo aver effettuato queste impostazioni, fare clic sul tasto Series Scan (scansione in serie).

Configurare sequenze di ripresa

Funzione

Con questa funzione è possibile combinare fino a sei intervalli di ripresa con differenti impostazioni hardware e la loro successione in una sequenza di ripresa. Facendo clic sul tasto Time Lapse (Intervallo temporale) si apre la seguente finestra di dialogo:

Configurazione della sequenza di ripresa

▶	Impostare nella finestra di dialogo Beam Path Setting (Impostazione percorso raggio) e nei tasti nel passo operativo Acquire (p. es. Pinhole, Series Scan Overview) tutti i parametri hardware necessari per il primo intervallo di ripresa (Lapse 1 = Intervallo 1). & vedi Impostare il percorso del raggio (pagina 140)
▶	Fare clic sul pulsante Define (Definisci) **(1)** per salvare queste impostazioni hardware per l'intervallo di ripresa. Vengono automaticamente salvate le impostazioni di tutte le funzioni di scansione. *Nella finestra di dialogo Setting (Impostazione) è possibile modificare quali parametri hardware vadano salvati con Define (Definisci). Per fare questo, selezionare il menu Tools, Option Settings, Register Instrument Parameter Settings (Strumenti, Impostazioni opzionali, Registro impostazioni parametri strumenti). Fare clic nel campo Choose Settings (Seleziona impostazioni) su IPS Time Lapse (Intervallo temporale IPS).*
▶	Ripetere questa procedura con le diverse impostazioni per ciascun ulteriore intervallo di ripresa (Lapse 2...8). Con Reset **(2)** è possibile annullare nuovamente le impostazioni.
▶	Facendo clic su Apply (Applica) **(3)** , le impostazioni definite per l'intervallo di ripresa vengono acquisite come impostazioni hardware attuali. Questo pulsante **non** va azionato: all'avvio della sequenza di ripresa le impostazioni vengono acquisite automaticamente. Con questa funzione si ha la possibilità di verificare ancora una volta le rispettive impostazioni. & vedi Adottare i parametri di ripresa di un esperimento (pagina 174)
▶	Nel caso in cui prima dell'avvio di un intervallo di ripresa il preparato dovesse essere imbiancato, evidenziare la casella di spunta Bleach (Imbianchimento) **(4)**. Viene utilizzato il modello di imbianchimento che è stato definito nella finestra di dialogo Bleach. Questo modello di imbianchimento viene utilizzato per tutti gli intervalli di ripresa. Evidenziare la casella di spunta Bleach Dialog (Dialogo imbianchimento) **(5)** per aprire la finestra di dialogo Bleach e per ridefinire il modello di imbianchimento.

	& vedi Definizione di un esperimento di imbianchimento (pagina 169)
▶	Impostare nel primo campo d'elenco, sotto Continue **(6)**, un tempo di pausa fra l'esecuzione dell'intervallo di ripresa attuale e del successivo.
▶	Selezionare nel secondo campo d'elenco, sotto Continue **(7)** , l'intervallo di ripresa (Lapse 1...8) da eseguire dopo l'esecuzione dell'intervallo attuale. Selezionando Finished (Terminato), la sequenza di ripresa termina con l'intervallo attuale.
▶	Fare clic sul pulsante Start **(8)** per avviare la sequenza di ripresa. Con Stop **(9)** è possibile interrompere la sequenza di ripresa.

Attivare acquisizioni immagini tramite segnali esterni (sono necessarie speciali impostazioni hardware)

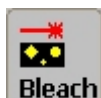
▶	Nel caso in cui un intervallo di ripresa vada avviato tramite un segnale esterno, fare clic sul pulsante Trigger (Attivazione) **(10)**. Nella finestra di dialogo ingrandita è possibile eseguire le seguenti impostazioni per i segnali di attivazione:

Campo d'elenco	Funzione
Input	Qui viene selezionato il canale per i segnali di attivazione in ingresso. Nel caso in cui sia selezionato un canale di attivazione, l'intervallo di ripresa viene avviato all'ingresso di un segnale di attivazione TTL attraverso il canale selezionato: & vedi Connettore per segnali dell'elettronica di attivazione (pagina 170) **Input 1:** Pin 4 del connettore dell'elettronica di attivazione **Input 2:** Pin 12 del connettore dell'elettronica di attivazione **Input 3:** Pin 5 del connettore dell'elettronica di attivazione **Input 4:** Pin 13 del connettore dell'elettronica di attivazione **Input –:** all'avvio dell'intervallo di ripresa non si attende fino ad un segnale di attivazione in ingresso. *Per l'utilizzo dell'ingresso di attivazione, si deve applicare la massa (0V) al pin 8 del connettore dell'elettronica di attivazione.*
Output	Qui viene selezionato il canale per i segnali di attivazione in uscita. Nel caso in cui sia selezionato un canale di attivazione, all'avvio di un intervallo di ripresa viene inviato un segnale di attivazione TTL attraverso il canale selezionato: & vedi Connettore per segnali dell'elettronica di attivazione (pagina 170) **Output 1** Pin 7 del connettore dell'elettronica di attivazione. Si tratta di un segnale di riga che resta sull'1 logico per la durata dell'acquisizione dati effettiva. *Il segnale di riga raddoppia la sua frequenza quando si commuta dall'acquisizione dati unidirezionale a quella bidirezionale.* **Output 2** Pin 15 del connettore dell'elettronica di attivazione. Si tratta di un segnale libero che può essere utilizzato per sbloccare apparecchi esterni in relazione ad eventi definiti. **Output –**: Non viene emesso alcun segnale di attivazione. *Per l'utilizzo dell'uscita di attivazione, si deve applicare una tensione di +5 V CC al pin*

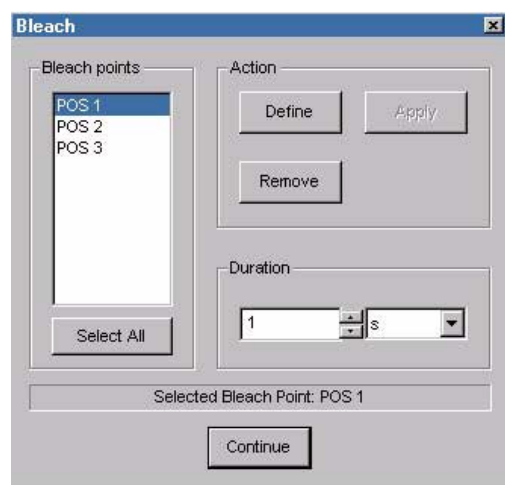
	11 e a massa (0V) al pin 8 del connettore dell'elettronica di attivazione.

Tutti gli ingressi sono disaccoppiati con disaccoppiatori ottici. La corrente massima con cui i disaccoppiatori ottici possono essere caricati è di 2mA. La durata d'impulso minima per segnali di attivazione in ingresso è di 100 msec.

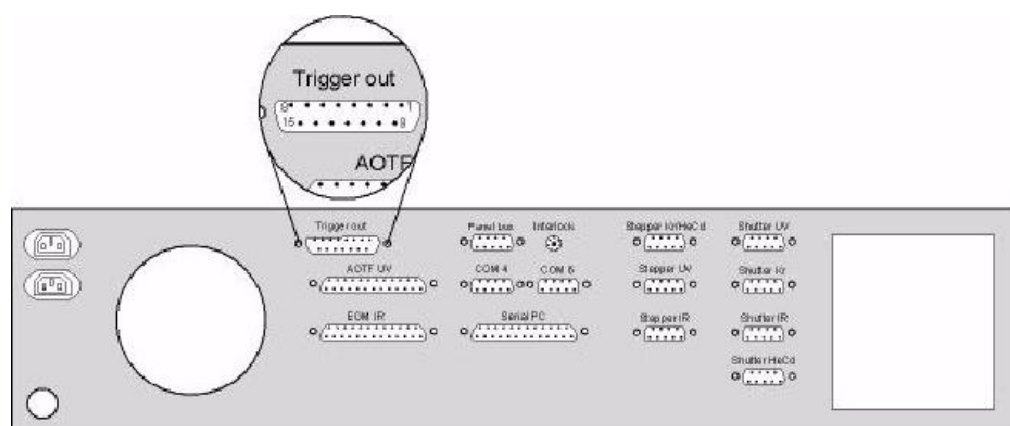
Nel caso in cui venga avviato un intervallo di ripresa di un segnale di attivazione in ingresso, l'esecuzione di una ripresa già in corso viene interrotta. Un intervallo di ripresa viene quindi avviato da un segnale di attivazione soltanto se sia stato premuto il pulsante Activate ***(11)*** *oppure Start.*

Definizione di un esperimento di imbianchimento

Funzione

In questa finestra di dialogo è possibile definire e salvare i punti di imbianchimento e una durata di imbianchimento specifica per ogni punto di imbianchimento. Questa funzione può essere utilizzata soltanto in correlazione con una sequenza di ripresa.

& vedi Configurazione della sequenza di ripresa (pagina 166)

▶	Mantenere il puntatore del mouse sull'immagine nella finestra di visualizzazione Viewer, quando è aperta la finestra di dialogo Bleach (Imbianchimento). Il simbolo del puntatore del mouse si trasforma in una crocetta.

▶	Selezionare nell'immagine i punti di imbianchimento facendo clic sulle posizioni corrispondenti nell'immagine. I punti di imbianchimento vengono inseriti nel campo d'elenco Bleach Points (Punti di imbianchimento) con la denominazione POS 1..n. Con il pulsante Remove (Rimuovi) è possibile rimuovere nuovamente i punti di imbianchimento.
▶	Per impostare la durata di imbianchimento per un singolo punto di imbianchimento, evidenziare la voce corrispondente nella finestra di dialogo e selezionare nel campo Duration (Durata) un intervallo temporale. Per impostare la stessa durata di imbianchimento per tutti i punti di imbianchimento, fare clic sul pulsante Select All (Seleziona tutto) ed impostare quindi la durata di imbianchimento.
▶	Fare clic sul pulsante Define (Definisci). In questo modo, oltre alla durata di imbianchimento, vengono salvate automaticamente anche l'intensità del laser e l'altezza z del punto di imbianchimento selezionato. È possibile variare l'intensità del laser nella finestra di dialogo Beam Path Setting (Impostazione percorso raggio). & vedi Impostare il percorso del raggio (pagina 140)
▶	Facendo clic su Apply (Applica), le impostazioni definite per il modello d'imbianchimento vengono acquisite come impostazioni hardware attuali.
▶	Fare clic su OK o su Continue, nel caso in cui sia stato aperto il dialogo dalla finestra di dialogo Time Lapse (Intervallo temporale).

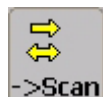
Il connettore per segnali dell'elettronica di attivazione si trova sulla parte posteriore dell'unità di alimentazione

Disposizione del connettore per segnali dell'elettronica di attivazione

Segnale	Connettore per segnali
Input 1	Pin 4 del connettore dell'elettronica di attivazione.
Input 2	Pin 12 del connettore dell'elettronica di attivazione.
Input 3	Pin 5 del connettore dell'elettronica di attivazione.
Input 4	Pin 13 del connettore dell'elettronica di attivazione.
Output 1	Pin 7 del connettore dell'elettronica di attivazione. In questo caso si tratta di un segnale di riga. Al contrario del segnale Output 3 (Pin 6), esso resta sull'1 logico solamente per la durata dell'acquisizione dati effettiva. Questo segnale è disponibile anche al di fuori della funzione Time Lapse (Intervallo temporale). & vedi Configurazione della sequenza di ripresa (pagina 166)
Output 2	Pin 15 del connettore dell'elettronica di attivazione. In questo caso si tratta di un segnale libero che può essere utilizzato nell'ambito della funzione Time Lapse (Intervallo temporale), per sbloccare apparecchi esterni in relazione ad eventi definiti. & vedi Configurazione della sequenza di ripresa (pagina 166)
Output 3	Pin 6 del connettore dell'elettronica di attivazione.

	In questo caso si tratta di un segnale di riga (line-clock). Il segnale ha un fronte crescente ad ogni avvio di una nuova riga. Il segnale resta sull'1 logico per tutto il tempo in cui il raggio di scansione si trova in una riga. Questo segnale è disponibile anche al di fuori della funzione Time Lapse (Intervallo temporale).
Output 4	Pin 14 del connettore dell'elettronica di attivazione. In questo caso si tratta di un segnale di quadro (frame-clock). Il segnale ha un fronte crescente ad ogni avvio di un nuovo quadro. Il segnale resta sull'1 logico per tutto il tempo necessario per la ripresa di un quadro. Questo segnale è disponibile anche al di fuori della funzione Time Lapse (Intervallo temporale).
GND	Pin 8 del connettore dell'elettronica di attivazione per utilizzare i segnali di attivazione in uscita e in entrata (massa).
+ 5 V DC	Pin 11 del connettore dell'elettronica di attivazione per utilizzare i segnali in uscita.

Il segnale di riga raddoppia la sua frequenza quando si commuta dall'acquisizione dati unidirezionale a quella bidirezionale.

Per un pratico utilizzo delle funzioni di attivazione è disponibile opzionalmente un pannello di comando di attivazione, descritto in dettaglio nell'Appendice (vedi pagina).

Selezionare una scansione unidirezionale o bidirezionale

Funzione
Facendo clic sul tasto Unidirectional/ Bidirectional Scan (Scansione unidirezionale/bidirezionale), si attiva la scansione bidirezionale. Non facendo clic sul tasto, si imposta automaticamente la scansione unidirezionale.

Nella scansione unidirezionale, ogni riga viene acquisita da sinistra verso destra. Mentre il raggio laser viene guidato al punto iniziale della nuova riga, non c'è acquisizione di nuovi dati. Nella scansione bidirezionale, la prima riga viene acquisita da sinistra verso destra, e la seconda da destra verso sinistra: per la registrazione dei dati si sfrutta quindi il movimento di ritorno del raggio laser. Pertanto, nella scansione bidirezionale, la velocità di scansione può essere aumentata.

Con la scansione bidirezionale attiva, si può raddoppiare la velocità di scansione impostata con il tasto Speed (velocità):

Unidirezionale	Bidirezionale	
200	Attualmente non disponibile	Righe di visualizzazione al secondo
400	800	Righe di visualizzazione al secondo
800	1600	Righe di visualizzazione al secondo
1000	2000	Righe di visualizzazione al secondo

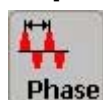
& vedi Selezionare una velocità di scansione (pagina 154)

Per bilanciare esattamente il movimento di andata e di ritorno a livello di pixel, si può impostare la fase tra i due movimenti Per fare questo, utilizzare il tasto Phase (Fase).

& vedi Impostare una fase (pagina 172)

Per motivi tecnici specifici dello strumento, impostando i gradi di velocità 800 o 1000, può non essere più possibile acquisire il campo di scansione massimo.Il sistema si inserisce automaticamente al fattore di zoomata 2 o al fattore di zoomata 4.

& vedi Zoom elettronico (pagina 149)

Impostare una fase

Funzione
Durante la ripresa bidirezionale dell'immagine, si può verificare uno sfasamento tra il raggio di scansione di andata e quello di ritorno. Con il tasto Phase (Fase) si apre una finestra di dialogo in cui è possibile correggere questo sfasamento:

 Con il puntatore, spostare il cursore della scala finché scompare lo spostamento di pixel nell'immagine.

La fase può essere regolata anche con l'apposita manopola della console di comando.

& vedi Gestire funzioni tramite la console di comando (pagina 258)

Integrazione
Per ogni fattore di zoomata è già stata effettuata una taratura della fase in fabbrica, con una regolazione dei valori corrispondenti. Data la dipendenza dalla temperatura di meccanica ed elettronica, durante il funzionamento potrebbero verificarsi leggere deviazioni rispetto ai valori standard impostati; con questa funzione, queste deviazioni possono essere aggiustate.

Ruotare un campo di scansione

Funzione
Con la funzione Scan Field Rotation (Rotazione campo di scansione) si può ruotare il campo di scansione: la rotazione non interessa né il preparato né il senso della scansione, bensì l'immagine intermedia microscopica.

▶	Nella finestra di dialogo Scan Field Rotation (Rotazione campo di scansione), selezionare un angolo di rotazione compreso tra 0 e 90 gradi. La posizione originale (0 gradi) dipende dalla posizione di riferimento fissata nella testina di scansione. Quando si accende lo strumento, questa posizione di riferimento viene automaticamente raggiunta.
▶	Fare clic sul pulsante Apply (Applica) per applicare l'angolo di rotazione impostato all'immagine attuale. Con Reset (Ripristina), si ritorna all'ultimo valore impostato. Selezionando Auto Apply (Applica automaticamente), le nuove impostazioni vengono automaticamente aggiornate nell'immagine.
▶	Fare clic sulla casella di spunta Visualize (Visualizza) per visualizzare l'angolo di rotazione nell'immagine. Questo può essere modificato direttamente nell'immagine riposizionando la linea bianca con il puntatore del mouse.

Posizionamento Y
Impostando la modalità di scansione xzy, xzt o xz e selezionando la casella di spunta Visualize, nell'immagine viene visualizzato anche il livello y sotto forma di linea rossa. Nella finestra di dialogo Series Scan Overview (panoramica scansione in serie) si può quindi modificare la posizione y, verificando il posizionamento nell'immagine tramite la linea rossa.

& vedi Selezionare una modalità di scansione (pagina 153)
& vedi Finestra di dialogo Series Scan Overview (pagina 156)

Applicazioni tipiche
Con questa funzione è possibile allineare motivi di superfici o strutture biologiche allungate rispetto all'osservatore.

Adottare i parametri di ripresa di un esperimento

Funzione

Con il tasto Apply (Applica) si possono adottare le impostazioni hardware utilizzate per un esperimento già esistente anche per la ripresa di un nuovo esperimento. In questo modo, con un semplice clic, i parametri di scansione ottimizzati per un'applicazione possono essere reimpostati per altre riprese:

▶	Attivare il record di dati immagine di cui si vogliono acquisire le impostazioni.
▶	Fare clic sul tasto Apply.

Ripresa di una riga nel processo di mediatura

Funzione

Con il tasto Line Average (Media linea) si avvia un processo di calcolo della media per la ripresa nel quale ogni singola linea viene acquisita più volte. Dai valori di intensità ripetutamente misurati in una linea si calcola la media aritmetica per ogni punto di scansione, e questa viene poi rappresentata nell'immagine finale. Solo dopo che il numero di mediature impostato viene acquisita la riga successiva del preparato. Il processo qui utilizzato determina un valore medio progressivo. Ciò significa che dopo la prima ripresa di una riga, ogni ripresa ripetuta viene mediata con l'ultima riga rappresentata e rappresentata nell'immagine finale (media dinamica).

Facendo clic sul tasto Line Average (Media linea), si apre una finestra di dialogo in cui è possibile impostare il numero di volte per cui una linea deve essere acquisita. Si può scegliere di ripetere il processo di scansione da 1 a 8 volte.

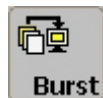
Con una funzione parallela, nel processo di mediatura si possono riprendere anche immagini intere.

& vedi Ripresa nel processo di mediatura (pagina 175)

Applicazioni tipiche

Questa funzione viene utilizzata soprattutto per la ripresa di campioni vivi.

Con preparati soggetti ad imbianchimento, la ripresa nel processo di mediatura non è consigliabile. Le ripetute riprese e il prolungato effetto luminoso ad esse associato possono provocare la distruzione del preparato.

Ripresa in modalità burst

Funzione

Per acquisizioni di immagini che implicano l'elaborazione di una grande quantità di dati da parte del computer, si può avere un ritardo del processo di scansione. La causa di ciò sta nel fatto che un'immagine ripresa viene visualizzata sullo schermo solo prima che altre immagini possano essere acquisite dallo scanner. Con la funzione burst è possibile disaccoppiare il processo di scansione del laser e l'aggiornamento dei dati immagine sullo schermo. A questo scopo viene decelerato l'instradamento dei dati immagine dalla memoria programma allo schermo, ma non il processo di scansione. Facendo clic sul tasto Burst, si possono selezionare le modalità con tempi di ritardo diversi:

Modalità	Descrizione
No Burst	I dati immagine vengono registrati e simultaneamente visualizzati in modo continuativo sullo schermo.
Frame Burst	Solo dopo la ripresa di un fotogramma, i dati immagine vengono visualizzati sullo schermo.
Complete Burst	Solo dopo la ripresa di una serie di immagini, i dati immagine vengono visualizzati sullo schermo.
Automatic	Il software imposta automaticamente la modalità più ottimale per una specifica applicazione.
Free Ratio Burst	Solamente ogni immagine x-te rilevata viene rappresentata sullo schermo

Impostazione della modalità Free Ratio Burst

▶	Selezionare nel menu Tools (Strumenti) l'opzione Settings (Impostazioni), quindi Register Scan Options (Opzioni Scansione Registro).
▶	Inserire nel campo Update Ratio (Rapporto di aggiornamento) un numero. Se ad esempio viene inserito il numero 3, sullo schermo verrà rappresentata un'immagine su tre.

I seguenti parametri possono incrementare la quantità di dati da elaborare tanto da comportare un ritardo nella presentazione sullo schermo: formati di scansione, velocità di scansione, scansione bidirezionale, numero dei canali di rilevamento attivi, calcolo di un'immagine in sovrapposizione e dimensione della finestra di visualizzazione Viewer.

Ripresa nel processo di mediatura

Funzione

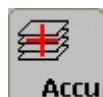
Con il tasto Average (Media) si avvia un processo di calcolo della media per la ripresa dell'immagine. In questa fase ogni singola immagine, quindi ogni sezione xy o xz, viene acquisita più volte. Dai valori di intensità ripetutamente misurati viene calcolata la media aritmetica per ogni punto di scansione, e questa viene visualizzata nell'immagine finale. Il processo qui utilizzato determina un valore medio progressivo. ciò significa che, dopo la ripresa della prima immagine, ogni nuova immagine acquisita

viene mediata con l'ultima immagine rappresentata e rappresentata nell'immagine finale (media dinamica).

Facendo clic sul tasto Average, si apre una finestra di dialogo dove è possibile impostare il numero di volte per cui una sezione deve essere acquisita. Si può scegliere di ripetere il processo di scansione da 1 fino a 64 volte.

Applicazioni tipiche
La ripresa nel processo di mediatura serve soprattutto alla soppressione dei disturbi. Nella microscopia a fluorescenza con campioni di fluorescenza debole il rivelatore riceve poca luce. A causa dell'esiguo numero di fotoni, le immagini risultano quindi disturbate. In casi simili, è possibile migliorare il rapporto segnale/disturbo effettuando più riprese e una mediatura costante dell'immagine.

Con preparati soggetti ad imbianchimento, la ripresa nel processo di mediatura non è consigliabile. Le ripetute riprese e il prolungato effetto luminoso ad esse associato possono provocare la distruzione del preparato.

Ripresa d'immagine nel processo di accumulazione

Funzione
Con il tasto Accumulation (Accumulazione) viene impiegato un processo di accumulazione per l'acquisizione di immagini. In questa fase ogni singola immagine, quindi ogni sezione xy o xz, viene acquisita più volte. I valori di intensità ripetutamente misurati vengono sommati per ogni punto di scansione e il totale viene riprodotto nell'immagine di risultato.

Facendo clic sul tasto Accumulation, si apre una finestra di dialogo dove è possibile impostare il numero di volte per cui una sezione deve essere acquisita. Si può scegliere da una fino a 16 ripetizioni del processo di scansione.

Applicazioni tipiche
Il processo di accumulazione serve a migliorare la qualità dell'immagine con riprese in cui si possono rilevare solo deboli segnali di fluorescenza.

Acquisizione immagini con una definizione digitale di 8 o 12 bit

Funzione
Tramite questa funzione, i valori di intensità analogici misurati dal rivelatore vengono letti per mezzo di un convertitore analogico-digitale come un segnale di 8 bit o come un segnale di 12 bit.

Integrazione
Durante la digitalizzazione del segnale di intensità analogico con una definizione digitale di 8 bit, possono essere rappresentati 256 diversi valori di intensità. Considerate le normali oscillazioni statistiche del campo di intensità tipico di campioni a fluorescenza, una digitalizzazione con 8 bit è in gran parte dei casi del tutto sufficiente per una ripresa grafica senza perdita di informazioni. Per

campioni caratterizzati da una maggiore dinamica di intensità (per esempio, campioni aventi campi di intensità molto deboli e campi di intensità molto marcati) si consiglia una ripresa grafica con una digitalizzazione di 12 bit. Con una digitalizzazione di 12 bit possono essere definiti 4096 diversi valori di intensità; d'altra parte, in questo modo, raddoppia anche la quantità di dati da salvare.

Applicazioni tipiche
Per la ripresa grafica di preparati aventi una dinamica di intensità molto elevata (perlopiù campioni di materiali caratterizzati da un'alta riflessività della superficie e, contemporaneamente, campi molto scuri).

Impostare il radiante della lente UV (Opzione)

Funzione
Tramite questa funzione, lo spostamento focale, disponibile per ogni obiettivo, tra luce visibile e luce di eccitazione UV viene ridotto ad un valore inferiore al potere risolvente. A tal fine, per ogni obiettivo adatto all'applicazione con la luce di eccitazione UV, viene automaticamente portata nel percorso del raggio una lente di correzione appropriata. Per sfruttare questa funzione di correzione occorre procedere come indicato:

▶	Premere il tasto Objective (di norma nella fase operativa Acquire). & vedi Selezionare un obiettivo (pagina 144)
▶	Selezionare un obiettivo UV dalla lista (contrassegnato nella lista).

In questo caso, l'ottica di correzione adatta all'obiettivo selezionato viene automaticamente portata nel percorso del raggio.

Lo spostamento focale tra luce visibile e luce UV è legato a motivi di natura fisica e non allo strumento.

Condizione secondaria
Per avere una correzione automatica dell'aberrazione cromatica tra luce visibile e luce UV, non è sufficiente ruotare manualmente l'obiettivo nel percorso del raggio.

Selezionare una traccia laser per lo sfondo d'immagine (ROI Scan)

Funzione
Questa funzione è necessaria per la ripresa di campi di analisi (ROI Scan). Con questo metodo di registrazione, lo sfondo dell'immagine viene acquisito con una lunghezza d'onda di eccitazione diversa rispetto ai campi di analisi selezionati (Regions of Interest). Con il tasto ROI si salvano le impostazioni laser per lo sfondo d'immagine prima di stabilire le lunghezze d'onda di eccitazione per ogni singolo campo di analisi tramite il tasto Configuration (Configurazione).

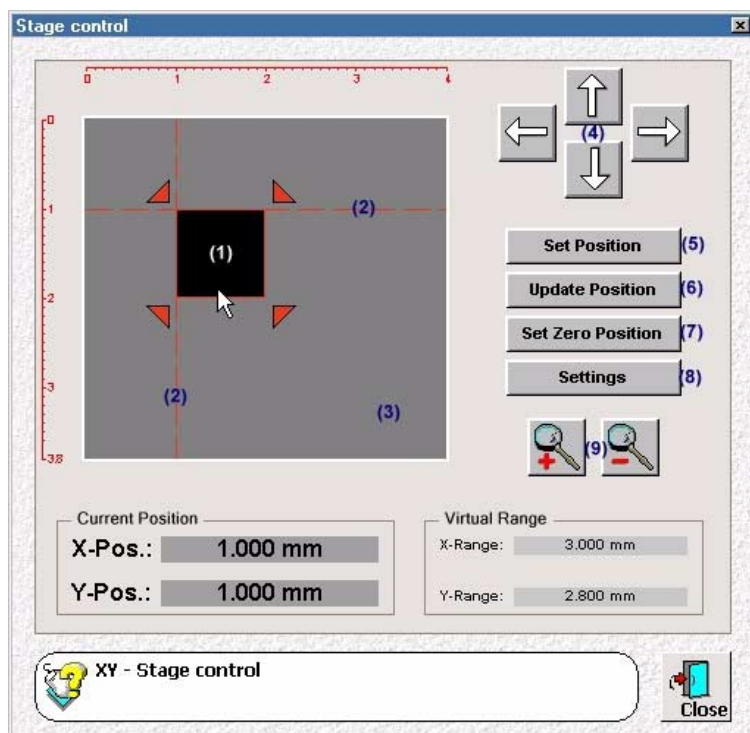
È possibile trovare ulteriori informazioni su questo argomento nel capitolo «Modalità procedurali ed esercizi di procedure scelte

Selezionare tracce laser per singoli campi di analisi (ROI Scan)

Funzione
Questa funzione è necessaria per la ripresa di campi di analisi (ROI Scan). Con questo metodo di registrazione, lo sfondo dell'immagine viene acquisito con una lunghezza d'onda di eccitazione diversa rispetto ai campi di analisi selezionati (Regions of Interest). Con il tasto Configuration (Configurazione) si apre una finestra di dialogo dove è possibile attribuire diverse tracce laser ai singoli campi di analisi.

È possibile trovare ulteriori informazioni su questo argomento nel capitolo «Modalità procedurali ed esercizi di procedure scelte

Controllare il portaoggetti XY

Funzione degli elementi di dialogo
Nella finestra di dialogo XY-Stage Control (controllo fase XY), si trovano i seguenti elementi di dialogo per il controllo del portaoggetti «Märzhäuser»:

Il simbolo del campo di scansione **(1)** nella finestra di dialogo varia di grandezza a seconda dei parametri che determinano anche fisicamente la grandezza del campo di scansione. Questi parametri sono l'ingrandimento dell'obiettivo, l'ampliamento del raggio, il formato di scansione e lo zoom elettronico. Il punto di intersezione delle linee guida **(2)** sul margine superiore sinistro del campo di scansione funge da riferimento per il posizionamento del portaoggetti. Le coordinate di questo punto di riferimento vengono visualizzate nel campo Current Position (posizione corrente).

Posizionamento del portaoggetti XY

Il portaoggetti XY può essere posizionato con il pulsante Set Position (Definisci posizione) **(5)**, con il puntatore, con le frecce nella finestra di dialogo **(4)**, con le frecce della tastiera oppure con il joystick.

Posizionamento con il pulsante

▶	Fare clic sul pulsante Set Position **(5)**. Si apre una finestra di dialogo dove si possono precisare le coordinate x e y del punto di riferimento su più posizioni del punto decimale.

Posizionamento con il puntatore

▶	Fare clic sul campo di scansione nella finestra di dialogo, tenere premuto il tasto sinistro del mouse e tirare il campo di scansione portandolo alla posizione desiderata. Il portaoggetti si muove solo rilasciando il tasto sinistro del mouse.
▶	Per accertarsi che il portaoggetti venga mosso solo quando è stata raggiunta la posizione desiderata, si può impostare un tempo di ritardo tra il rilascio del mouse e lo spostamento del portaoggetti. Fare clic sul pulsante Settings (impostazioni) **(8)** ed impostare il tempo di attesa nel registro Delay (Ritardo).

Posizionamento con le frecce

▶	Attivare le quattro frecce nella finestra di dialogo **(4)** o le frecce della tastiera. *Posizionando il portaoggetti con le frecce della tastiera, il campo di scansione viene spostato esattamente sulla lunghezza del campo di scansione: in questo modo un preparato più grande del campo di scansione può essere acquisito in modo continuo.*

▶	Per accertare che il portaoggetti venga mosso solo quando è stata raggiunta la posizione desiderata, si può impostare un tempo di ritardo tra l'attivazione dei tasti e lo spostamento del portaoggetti. Fare clic sul pulsante Settings (impostazioni) **(8)** ed impostare il tempo di attesa nel registro Delay (Ritardo).

Posizionamento con il joystick

▶	Se si muove il portaoggetti con il joystick, le coordinate nel campo Current Position (Posizione corrente) non vengono aggiornate. Fare clic sul pulsante Update Position (Aggiorna posizione) **(6)** per visualizzare la posizione attuale.

Impostare la velocità di posizionamento
La velocità con cui il portaoggetti viene mosso e il tempo a disposizione sono regolabili.

▶	Fare clic sul pulsante Settings **(8)** e definire nel registro Speed (Velocità) la velocità di posizionamento minima e massima tirando il cursore o immettendo i valori specifici nei campi d'inserimento.
▶	Nel campo d'inserimento Positioning Time (Tempo di posizionamento) definire il tempo di posizionamento, cioè il tempo entro il quale il portaoggetti deve aver raggiunto la propria posizione. Si tenga presente che una velocità elevata richiede un tempo di posizionamento breve, mentre una bassa velocità richiede un tempo di posizionamento lungo.

Definire il punto zero

▶	Fare clic sul pulsante Set Zero Position (Definisci posizione nulla) **(7)**, per definire l'attuale posizione del portaoggetti (punto di intersezione delle linee guida nella finestra di dialogo) come punto nullo. Questo valore viene modificato anche nella legenda Hardware.

Modificare l'unità di misura del campo di posizionamento
I dati di misura ai bordi laterali del campo di posizionamento del portaoggetti **(3)** cambiano a seconda dell'unità selezionata. Si possono impostare nanometri (nm), micrometri (mm), millimetri (mm), centimetri (cm) o metri (m).

▶	Fare clic sul pulsante Settings **(8)** e selezionare l'unità di misura nel registro Unit (unità).

Ingrandire la rappresentazione del campo di posizionamento
Per poter posizionare esattamente il portaoggetti anche nel campo di micrometri, si può ingrandire la rappresentazione del campo di scansione e del campo di posizionamento nella finestra di dialogo.

▶	Fare clic sui pulsanti + e – **(9)** per ingrandire o ridurre la rappresentazione del campo di posizionamento.

La posizione del portaoggetti XY può essere salvata anche con un record di parametri di registrazione. In questo modo, il portaoggetti XY può essere utilizzato anche con sequenze di registrazione.

& vedi Configurare sequenze di ripresa (pagina 166)

Selezionare l'attuatore Z

Funzione
Con il tasto Z, si seleziona l'attuatore dello spostamento del preparato in direzione Z.

▶	Scegliere Z-Galvo per utilizzare il tavolo di messa a fuoco di precisione comandato dal galvanometro per il posizionamento Z. Con questo portaoggetti Z si possono creare riprese di sezioni orizzontali XY e sezioni verticali XZ. Viene anche utilizzato con stativi per microscopio diritti o invertiti.
▶	Scegliere Z-Wide se si vuole utilizzare il portaoggetti Z elettromotorizzato (con stativi per microscopio diritti) o la torretta portaobiettivi (con stativi per microscopio invertiti) per il posizionamento Z. Con questa funzione sono possibili solo riprese di sezioni XY orizzontali (vedere tabella in basso).

Modalità di scansione disponibili in base all'attuatore Z
Selezionando l'opzione Z-Wide, non è più possibile selezionare tutte le modalità di scansione. Quando si fa clic sul tasto Scan Mode (Modalità di scansione), le relative voci non figurano più nell'elenco.

& vedi Selezionare una modalità di scansione (pagina 153)

Attuatore	Modalità di scansione									
Z-Galvo	xyz	xzy	xt	xyt	xzt	xyzt	xyλ	xzλ	xytλ	xyzλ
Z-Wide	xyz	—	xt	xyt	—	xyzt	xyλ	—	xytλ	xyzλ

Impostare una serie temporale

Funzione
Con il tasto Time (Tempo) si apre la finestra di dialogo Time Configuration (Configurazione temporale), dove si imposta la registrazione di una serie temporale. I parametri impostabili in questa finestra di dialogo dipendono dalla modalità di scansione selezionata. La registrazione, che può avvenire più volte di seguito e ad un determinato intervallo di tempo, può riguardare una riga (xt), una sezione orizzontale (xyt), una sezione verticale (xzt) o una pila di sezioni orizzontali (xyzt).

Il tasto Time si attiva solo se è stata selezionata una modalità di scansione con dimensione di tempo tramite il tasto Mode (Modalità).

& vedi Selezionare una modalità di scansione (pagina 153)

Per una serie temporale nella modalità di scansione xt, vengono mostrati i seguenti parametri nella finestra di dialogo.

ΔT	Durata di registrazione di una riga (*non impostabile dall'utente*)
Lines	Numero di registrazioni della riga
Lines per page	Numero di righe per pagina di memoria
Pages	Numero di pagine di memoria (*viene calcolato automaticamente*)
Maximize	Registrazione del maggior numero di righe possibili per pagina di memoria
Complete Time	Durata complessiva della registrazione, cioè prodotto di **Δ** T e numero di registrazioni

Con il pulsante Calculate (Calcola) si può calcolare quante pagine di memoria siano richieste per un determinato numero di linee per pagina.

Per una serie temporale nella modalità di scansione xyt o xzt, vengono mostrati i seguenti parametri nella finestra di dialogo:

ΔT	Durata di registrazione per una sezione xy o xz più intervallo di pausa
Minimize	Viene usato l'intervallo minore possibile (ΔT)
Frames	Numero di acquisizioni della sezione xy o della sezione xz
Complete Time	Durata complessiva della registrazione, cioè prodotto di **Δ**T e numero di registrazioni

Per una serie temporale in una modalità di scansione xyzt, vengono mostrati i seguenti parametri nella finestra di dialogo:

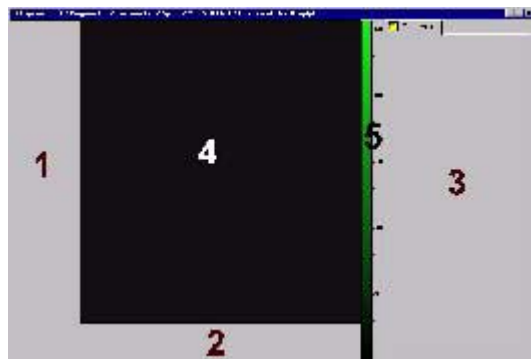
ΔT	Durata di registrazione per una pila di sezioni xy più intervallo di pausa
Minimize (minimizza)	Viene usato l'intervallo minore possibile (ΔT)
Stacks (pile)	Numero di acquisizioni della pila d'immagini
Complete Time (durata totale)	Durata complessiva della registrazione, cioè prodotto di **Δ**T e numero di registrazioni

Ciascun parametro può essere calcolato in base agli altri parametri. Durante l'immissione dei valori, occorre considerare il funzionamento specifico della finestra di dialogo. Il campo d'inserimento su cui si fa clic viene disattivato:

▶	Fare clic sul parametro da calcolare. Il relativo campo d'inserimento appare grigio.
▶	A questo punto, immettere i valori relativi agli altri parametri.
▶	Fare clic su Apply (applica) per calcolare il parametro. Facendo clic su Reset (Ripristina) vengono mostrati gli ultimi valori salvati.

Dopo aver effettuato queste impostazioni, fare clic sul tasto Series Scan (Scansione in serie).

Funzioni di presentazione dati

Finestra di visualizzazione Viewer

Nell'impostazione standard, la finestra di visualizzazione Viewer è costituita da tre campi fondamentali. Al centro si trova la finestra immagine (4) in cui vengono visualizzate le immagini riprese. A sinistra e sotto a questa finestra possono essere disposti i blocchi di tastiera (1) e (2) e, alla loro destra, la legenda Experiment (3) (Esperimento). È possibile selezionare altre impostazioni standard di una finestra di visualizzazione e salvare le configurazioni definite dall'utente come dima.

& vedi Salvare la finestra di visualizzazione Viewer come modello (pagina 259)

Blocchi di tastiera (1) e (2)
Come impostazione standard, nel blocco di tastiera a sinistra della finestra immagine si trovano i tasti per la visualizzazione dell'immagine, mentre nel blocco di tastiera sottostante la finestra si trovano i tasti per sfogliare le singole immagini di una serie. Entrambi i blocchi tastiera possono essere spostati all'interno della finestra di visualizzazione Viewer oppure estratti da questa come finestra separata. A questo scopo fare clic con il puntatore sul doppio margine del blocco di tastiera e, tenendo premuto il tasto del mouse, portarlo alla posizione desiderata.

Finestra immagine (4)
Quando si posiziona il puntatore su un punto a scelta all'interno della finestra immagine e si fa clic sul tasto destro del mouse, si apre un menu contestuale che offre i seguenti comandi:

Comando	Funzione		
Send to	▸ Experiment	▸ Selection (raw)	I dati grezzi di un particolare contrassegnato nella finestra immagine vengono copiati nell'esperimento corrente come una nuova immagine. La nuova immagine può essere elaborata.
		▸ Selection (snapshot)	La copia su schermo di un particolare contrassegnato nella finestra immagine viene creata come nuova immagine nell'esperimento corrente. La nuova immagine non può più essere elaborata.
		▸ All (snapshot)	La copia su schermo dell'intera finestra immagine attuale viene creata come nuova immagine nell'esperimento corrente. La nuova immagine non può più essere elaborata.
	▸ Printer	▸ Selection	Il particolare contrassegnato nella finestra immagine viene stampato.
		▸ All	L'intera finestra immagine corrente viene stampata.
Left buttons	Il blocco di tastiera a sinistra della finestra immagine viene attivato o disattivato.		
Bottom buttons	Il blocco di tastiera sottostante la finestra immagine viene attivato o disattivato.		

LUT	Le tabelle di classificazione cromatica dell'immagine attuale vengono aperte o chiuse.
Legend	La legenda Experiment si apre o si chiude.
Full screen	La finestra di visualizzazione Viewer viene ingrandita a tutto schermo.
Viewer Options	La finestra di dialogo Viewer Options si apre.

Le **tabelle di classificazione cromatica (5)** vengono visualizzate come barre colori a destra, accanto alla finestra immagine. Tenendo puntato il mouse sulla barra colori interessata, compaiono dei punti di presa sull'estremità superiore e inferiore della barra colori. Con questi punti di presa si può limitare l'attuale tabella di classificazione cromatica ad un determinato campo di intensità e caricare una seconda tabella di classificazione cromatica. In questo modo si ha la possibilità di aumentare graficamente il contrasto dell'immagine.

▶	Tirare il punto di presa superiore verso il basso o il punto di presa inferiore verso l'alto.
▶	Fare doppio clic sul campo al di sopra e al di sotto del punto di presa in questione.
▶	Si apre la finestra di dialogo Select LUT's (Seleziona tabelle di classificazione cromatica), dove si può selezionare una seconda tabella di classificazione cromatica.
▶	Il campo di intensità superiore e inferiore viene visualizzato nei colori della seconda tabella di classificazione cromatica.

& vedi Selezionare le tabelle di classificazione cromatica (LUT) (pagina 197)

Legenda Experiment (3)
Nella legenda Experiment (Esperimento) vengono registrati diversi parametri grafici di una ripresa. Facendo clic su un punto a scelta della legenda, l'utente potrà stabilire quali parametri visualizzare. Si apre l'elenco di tutte le voci disponibili, quindi occorre selezionare la voce prescelta. Tenendo il puntatore su un punto a scelta all'interno della legenda Experiment e facendo clic sul tasto destro del mouse, si apre un menu contestuale che offre anche i seguenti comandi:

Comando	**Funzione**	
Experiment	▸ Edit	Nella finestra di dialogo Edit Legend (Modifica legenda) si può inserire un nome per la legenda (Title/titolo), definire il numero delle voci (Number of legend entries) oppure cancellare tutte le voci (Clear all entries).
	▸ Activate	La legenda Experiment viene visualizzata nella finestra di visualizzazione Viewer.
	▸ Remove	L'attuale legenda Experiment viene cancellata.
Add Experiment tab	Viene creata una nuova legenda Experiment nella finestra di visualizzazione Viewer.	

Legenda Hardware
Nella legenda Hardware vengono registrate le impostazioni hardware di una ripresa. Per aprire questa legenda, scegliere l'opzione Hardware Legend (Legenda hardware) nel menu View. Per selezionare le voci da visualizzare nella legenda, fare clic sul pulsante Edit (Modifica). Si apre la finestra di dialogo Edit Legend Entries (Modifica voci legenda):

▶	Nel campo d'elenco Available Entries (Voci disponibili) vengono visualizzate tutte le voci disponibili. Selezionare le voci da far comparire nella legenda, fare quindi clic sul pulsante Add (Aggiungi) per aggiungerle nel campo d'elenco Show entries (Mostra voci).
▶	Nel campo d'elenco Show entries (Mostra voci) figurano le voci visualizzate nella legenda. Con il pulsante Remove (Rimuovi), le voci possono essere di nuovo estratte dalla legenda.
▶	Con i pulsanti Move up (Alza) e Move down (Abbassa) si possono alzare o abbassare una o più voci della lista.
▶	Con i pulsanti Edit grid color (Modifica colore griglia) e Edit background color (Modifica colore sfondo) si può modificare il colore del quadro e dello sfondo della legenda.

La legenda Hardware viene automaticamente disposta sul margine destro dell'interfaccia di comando. Grandezza e posizione della legenda possono comunque essere modificate a piacere:

▶	Per modificare la larghezza della legenda, usare il puntatore del mouse per tirare il margine alla posizione desiderata.
▶	Per modificare la posizione della legenda, fare doppio clic sul doppio margine della legenda o fare clic sul simbolo ▲. La legenda viene tolta dalla interfaccia di comando come finestra. Tenendo premuto il tasto sinistro del mouse, tirare la legenda nella posizione desiderata.

Se la legenda è ingrandita per tutta la larghezza dell'interfaccia di comando, è possibile riportarla a margine nella posizione originale riducendo prima l'altezza della legenda, e poi spostandola sul margine.

Opzione New Window (Nuova finestra)
Facendo clic nel menu Window (Finestra) l'opzione New Window, si ha la possibilità di aprire un'altra finestra di visualizzazione, con la stessa immagine visualizzata della finestra correntemente aperta. Con questo comando, quindi, non si crea un nuovo esperimento, ma si apre solo una seconda visualizzazione sui dati immagine attuali. Il vantaggio di questa opzione è rappresentato dalla possibilità di avere contemporaneamente diverse rappresentazioni degli stessi dati immagine. Per distinguersi, questa copia della finestra di visualizzazione attuale contiene un numero progressivo dopo la terminazione del file.

Visualizzare riprese in miniatura nel browser Experiment

Funzione
Con il browser Experiment (Esperimento) si ha la possibilità di visualizzare in miniatura tutte le riprese di un esperimento. Si ottiene così un prospetto dell'inventario di immagini presente con un rapido accesso alle singole riprese.

▶	Selezionare un esperimento nella finestra di visualizzazione Experiment Overview (Panoramica

	esperimento).
▶	Fare clic sul tasto Browse (sfoglia) per aprire il browser Experiment. Tutte le riprese dell'esperimento vengono mostrate in miniatura. Le serie di immagini appaiono come proiezione massima.
▶	Fare clic su una miniatura per aprire il record di dati immagine completo nella finestra di visualizzazione Viewer.
▶	Fare di nuovo clic sul tasto Browse per chiudere il browser Experiment.

Finestra di dialogo Viewer Options

Finestra di dialogo Viewer Options, icona 3D

Funzione
Per aprire la finestra di dialogo Viewer Options (Opzioni visualizzatore), selezionare l'opzione Experiment Overview (Panoramica esperimento) nel menu View (Visualizzazione).
A sinistra dell'interfaccia di comando compare la finestra di visualizzazione Experiment Overview. Nella parte superiore della finestra di visualizzazione, le immagini riprese vengono visualizzate in un albero di directory. Nella parte inferiore si trova la finestra di dialogo Viewer Options. In questa finestra di dialogo si possono effettuare le impostazioni fondamentali per diverse funzioni software. A sinistra vengono visualizzate le icone corrispondenti alle varie funzioni, a destra i relativi registri. Quando si apre la finestra di dialogo, compaiono le icone delle funzioni con le quali si sta correntemente lavorando. Per visualizzare tutte le icone, fare clic sul comando Show all (Mostra tutte).

Nei registri dell'icona 3D si possono effettuare le impostazioni opzionali per le seguenti funzioni:

& vedi Ruotare un'immagine tridimensionale (pagina 214)
& vedi Spostare un'immagine tridimensionale (pagina 215)
& vedi Zoomare un'immagine tridimensionale (pagina 215)

Nel **registro Navigation** (Navigazione) vengono mostrati i valori numerici delle azioni eseguite con i tasti Rotate (Ruota),Move (Sposta) e Zoom (Zooma) (e con il puntatore del mouse).

Nel **campo Rotation** (Rotazione) si può ribaltare un'immagine tridimensionale in tutte e tre le direzioni spaziali modificando il grado dell'angolo dei tre assi. L'immagine tridimensionale viene ruotata intorno ad un punto fisso che si trova al centro dell'immagine. Per comprendere la funzione di rotazione, è preferibile modificare l'angolo di un solo asse, mentre gli altri due sono impostati a 0:

Rotation	Funzione
X da 0° a 45°	L'immagine tridimensionale viene ruotata di 45° intorno al punto fisso nella direzione dell'asse negativo z.
Y da 0° a 45°	L'immagine tridimensionale viene ruotata di 45° intorno al punto fisso nella direzione dell'asse negativo x.
Z da 0° a 45°	L'immagine tridimensionale viene ruotata di 45° intorno al punto fisso nella direzione dell'asse negativo y.

Nel **campo Translation** (Traslazione), l'immagine tridimensionale può essere spostata verso destra o sinistra, in alto o in basso, o può essere ingrandita o ridotta cambiando i valori delle coordinate. Se si inseriscono numeri decimali, si utilizza il punto come un simbolo decimale.

Translation	Funzione
X	Con valori positivi, l'immagine tridimensionale viene spostata a destra, con valori negativi verso sinistra.
Y	Con valori positivi, l'immagine tridimensionale viene ingrandita, con valori negativi ridotta.
Z	Con valori positivi l'immagine tridimensionale viene spostata verso l'alto, con valori negativi verso il basso.

Nel **campo Predefined** (Predefinita), facendo clic sui pulsanti Top view (Vista superiore) e Side view (vista laterale) si può visualizzare l'immagine nella vista superiore o laterale preimpostata.

Nel **registro Display**, si può fare clic su uno dei comandi elencati per aprire o chiudere il relativo elemento di configurazione dell'immagine tridimensionale nella finestra di visualizzazione Viewer:

Graphic Elements	Funzione
Show LUT	Visualizzare la tabella di classificazione cromatica selezionata (color look-up table) sull'asse z.
Show scale	Visualizzare la scala di misura.
Show bounding box	Visualizzare il parallelepipedo che limita il volume di misurazione.
Show axes	Visualizzare gli assi delle coordinate.
Show data during 3D motion	Visualizzare i dati immagine mentre l'immagine tridimensionale viene ruotata, spostata o ingrandita e ridotta.

Finestra di dialogo Viewer Options, icona Display

Funzione
Per aprire la finestra di dialogo Viewer Options (Opzioni visualizzatore), selezionare l'opzione Experiment Overview (Panoramica esperimento) nel menu View (Visualizzazione).
A sinistra dell'interfaccia di comando compare la finestra di visualizzazione Experiment Overview. Nella parte superiore della finestra di visualizzazione, le immagini riprese vengono visualizzate in un albero di directory. Nella parte inferiore si trova la finestra di dialogo Viewer Options. In questa finestra di dialogo si possono effettuare le impostazioni fondamentali per diverse funzioni software. A sinistra vengono visualizzate le icone corrispondenti alle varie funzioni, a destra i relativi registri. Quando si apre la finestra di dialogo, compaiono le icone delle funzioni con le quali si sta correntemente lavorando. Per visualizzare tutte le icone, fare clic sul comando Show all (mostra tutte).

Nei registri dell'icona Display si possono effettuare le impostazioni opzionali per le seguenti funzioni:

& vedi Avviare e terminare una pellicola (pagina 204)

Nel **registro Settings** (Impostazioni), l'immagine mostrata nella finestra di visualizzazione può essere ingrandita o ridotta con lo zoom grafico:

n-1	L'immagine viene ridotta: nell'immagine finale n pixel vengono rappresentati come 1 pixel.
Automatic	L'immagine viene visualizzata nel formato originale.
1-n	L'immagine viene ingrandita: nell'immagine finale 1 pixel viene rappresentato come n pixel.

Il Leica Confocal Software dispone di tre funzioni zoom differenti fra loro: lo zoom elettronico, lo zoom tridimensionale e lo zoom grafico.

& vedi Zoomare un'immagine tridimensionale (pagina 215)
& vedi Zoom elettronico (pagina 149)

Nello stesso registro, fare clic su uno dei punti di selezione per aprire o chiudere il relativo elemento di configurazione nella finestra di visualizzazione Viewer:

Coordinates	Viene visualizzata la posizione z dell'immagine attuale.
Scale	Viene visualizzata una barra graduata con indicazione della lunghezza.
Grid (raster)	Viene posizionato un raster sopra l'immagine attuale.

La lunghezza della barra graduata e la larghezza del raster vengono calcolate in rapporto all'obiettivo, allo zoom elettronico e all'ampliamento del raggio.

Nel **registro Movie** (Film) si può determinare la velocità a cui deve scorrere la sequenza filmata di una serie di immagini. Si può scegliere un valore compreso tra 6 fotogrammi al minuto e 25 fotogrammi al minuto:

▶	Con la freccia del mouse, spostare il cursore della scala al valore desiderato.
▶	Se la sequenza filmata deve scorrere dalla prima all'ultima immagine, e poi in ordine inverso di nuovo fino alla prima immagine, scegliere la modalità Ping-Pong. Se non si seleziona questa modalità, la sequenza filmata comincia sempre di nuovo con la prima immagine.

Finestra di dialogo Viewer Options, icona Charts

Funzione
Per aprire la finestra di dialogo Viewer Options (Opzioni visualizzatore), selezionare l'opzione Experiment Overview (panoramica esperimento) nel menu View (Visualizzazione).
A sinistra dell'interfaccia di comando compare la finestra di visualizzazione Experiment Overview. Nella parte superiore della finestra di visualizzazione, le immagini riprese vengono visualizzate in un albero di directory. Nella parte inferiore si trova la finestra di dialogo Viewer Options. In questa finestra di dialogo si possono effettuare le impostazioni fondamentali per diverse funzioni software. A sinistra vengono visualizzate le icone corrispondenti alle varie funzioni, a destra i relativi registri. Quando si apre la finestra di dialogo, compaiono le icone delle funzioni con le quali si sta correntemente lavorando. Per visualizzare tutte le icone, fare clic sul comando Show all (Mostra tutte).

Nel registro dell'icona Charts si possono effettuare le impostazioni opzionali per le seguenti funzioni:

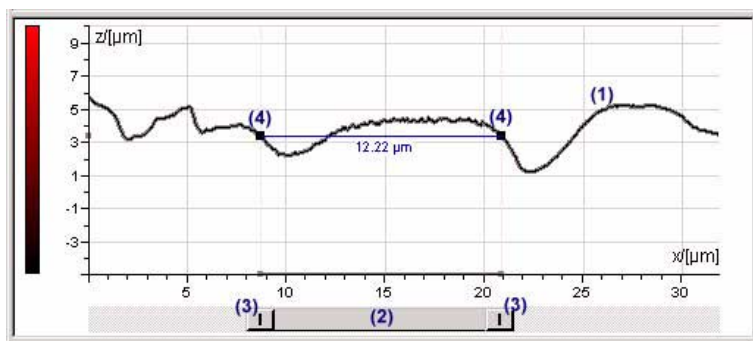
Prof.	& vedi Misurazione di un profilo lungo un segmento (pagina 243)
Pr. (z)	& vedi Misurazione di un profilo all'interno di un campo di analisi (ROI) (pagina 241)
Mat.	& vedi Misurazione di superfici e volumi (pagina 272)

	& vedi Misurazioni di rugosità lungo un segmento (pagina 260)

Le opzioni presenti nel **registro Charts** (Grafici) possono essere selezionate solo dopo aver attivato una funzione di quantificazione con uno di questi tasti.

Attivare una misurazione di due punti

▶	Nel **campo Measurement** (Misurazione) fare clic su 2 Point (Due punti) per attivare la misurazione di due punti.

Ognuno dei tasti precedentemente indicati apre una finestra di visualizzazione in cui compaiono una curva di misurazione e dei valori statistici.
Selezionando la misurazione di due punti, nella finestra di visualizzazione sotto alla curva di misurazione (1) compare un calibro a corsoio (2) con due punti di misurazione (3). La posizione di entrambi i punti di misurazione nella curva di profilo viene indicata con dei piccoli quadrati neri (4). In questo modo il campo da analizzare all'interno della curva di misurazione può essere impostato con maggiore precisione. I dati statistici visualizzati sotto la curva di misurazione vengono inoltre aumentati dai seguenti valori di misurazione: posizione dei punti di misurazione, distanza dei punti di misurazione, valore di misurazione ai punti di misurazione, differenza delle grandezze misurate fra i punti di misurazione.

Cambiare la posizione e la lunghezza del calibro a corsoio

▶	Per modificare la posizione, si afferra il cursore al centro con il tasto sinistro del mouse e, tenendo quest'ultimo premuto, lo si sposta nella posizione desiderata.
▶	Per modificare la lunghezza del cursore, lo si afferra su un lato con il puntatore del mouse e, premendo il tasto sinistro del mouse, lo si ingrandisce o diminuisce.

Modificare il ridimensionamento della curva di misurazione
Di norma, il ridimensionamento delle curve di misura viene adattato automaticamente dal software al campo delle intensità presente ogni volta in una ripresa. Il ridimensionamento può essere comunque modificato anche manualmente:

▶	Togliere la spunta dalla casella Auto per disattivare il ridimensionamento automatico.
▶	A questo punto di possono ridefinire separatamente il limite superiore e inferiore del campo di valori per ogni singola curva di misura (ciascun canale di rilevamento).
▶	Controllare il risultato del nuovo ridimensionamento direttamente nella finestra di visualizzazione.

Finestra di dialogo Viewer Options, icona Multicolor

& vedi capitolo „Pacchetti software opzionali / Multicolor“, pagina 281

Finestra di dialogo Viewer Options, icona Online Measure

Struttura della finestra di visualizzazione Experiment Overview
Per aprire la finestra di dialogo Viewer Options (Opzioni visualizzatore), selezionare l'opzione Experiment Overview (panoramica esperimento) nel menu View (Visualizzazione). A sinistra dell'interfaccia di comando compare la finestra di visualizzazione Experiment Overview. Nella parte superiore della finestra di visualizzazione, le immagini riprese vengono visualizzate in un albero di directory. Nella parte inferiore si trova la finestra di dialogo Viewer Options. In questa finestra di dialogo si possono effettuare le impostazioni fondamentali per diverse funzioni software. A sinistra vengono visualizzate le icone corrispondenti alle varie funzioni, a destra i relativi registri. Quando si apre la finestra di dialogo, compaiono le icone delle funzioni con le quali si sta correntemente lavorando. Per visualizzare tutte le icone, fare clic sul comando Show all (Mostra tutte).

Nel registro dell'icona Online Measure (Misurazione on line) si possono effettuare le impostazioni opzionali per le seguenti funzioni:

Con il cursore di questa funzione si può stabilire per quante sezioni ottiche vanno visualizzati graficamente i valori di lettura di una misurazione on line. Sulla base del grafo della misurazione on line è possibile riconoscere lo sviluppo tendenziale di un esperimento.

I dati di trend sono solo temporanei e non possono essere salvati.Tuttavia, dati di questo tipo possono essere esportati tramite il menu contestuale (tasto destro del mouse) e copiati in una pagina di presentazione.

& vedi Esportare dati di quantificazione (pagina 246)
& vedi Copiare grafi di quantificazione nella pagina di presentazione (pagina 245)

Applicazioni tipiche
Valutazione quantitativa di record di dati.

Finestra di dialogo Viewer Options, icona Projections

Funzione
Per aprire la finestra di dialogo Viewer Options (Opzioni visualizzatore), selezionare l'opzione Experiment Overview (Panoramica esperimento) nel menu View (Visualizzazione).
A sinistra dell'interfaccia di comando compare la finestra di visualizzazione Experiment Overview. Nella parte superiore della finestra di visualizzazione, le immagini riprese vengono visualizzate in un albero di directory. Nella parte inferiore si trova la finestra di dialogo Viewer Options. In questa finestra di dialogo si possono effettuare le impostazioni fondamentali per diverse funzioni software. A sinistra vengono visualizzate le icone corrispondenti alle varie funzioni, a destra i relativi registri. Quando si apre la finestra di dialogo, compaiono le icone delle funzioni con le quali si sta correntemente lavorando. Per visualizzare tutte le icone, fare clic sul comando Show all (Mostra tutte).

Nei registri dell'icona Projections (Proiezioni) si possono effettuare le impostazioni opzionali per le seguenti funzioni:

& vedi Proiezione massima di una pila di immagini con un asse di proiezione invariabile (pagina 209)
& vedi Proiezione media di una pila di immagini con un asse di proiezione invariabile (pagina 210)
& vedi Proiezione trasparente di una pila di immagini con un asse di proiezione invariabile (pagina 211)
& vedi Creare una proiezione SFP di una pila di immagini (pagina 212)

Nel **registro Projections** (Proiezioni) vengono suggerite diverse opzioni per la creazione di un'immagine di proiezione. Se i picchi di intensità, la media aritmetica o una media ponderata delle intensità devono essere visualizzate nell'immagine di proiezione, selezionare la relativa opzione. Il fattore di ponderazione deve essere modificato per la proiezione trasparente. Impostare un valore di soglia o un fattore di ridimensionamento per le intensità da rappresentare.

Tipo	**Funzione**
Maximum projection	Per ogni colonna di punti di scansione analizzata, nell'immagine di proiezione viene visualizzato il punto di scansione avente la massima intensità come riferimento per tutti i valori all'interno della colonna.
Average projection	Per ogni colonna di punti di scansione analizzata, nell'immagine di proiezione viene visualizzata la media aritmetica delle intensità misurate nella colonna.
Transparent projection	Per ogni colonna di punti di scansione analizzata, nell'immagine di proiezione viene visualizzata una media ponderata delle intensità misurate nella colonna.

Transparent factor	**Funzione** (attiva solo per la proiezione trasparente)
Spostare il cursore sulla scala	Quanto più alto è il fattore di trasparenza a α ($0 < \alpha < 1$) impostato, quanto più intenso è il flusso dei valori di intensità dal livello inferiore della pila di immagini all'immagine di proiezione.

Threshold	**Funzione** (attiva solo per proiezione media e trasparente)
Spostare il cursore sulla scala	Le intensità al di sotto del valore di soglia impostato non vengono più considerate per il calcolo dell'immagine di proiezione.

Scaling	**Funzione** (attiva solo per proiezione media e trasparente)
Rescale to maximum	I valori di intensità calcolati vengono normalizzati alle intensità massime possibili.

Nel **registro SFP** vengono suggerite delle opzioni per la creazione di un'immagine di proiezione SFP.

& vedi Principio e tipi di proiezioni (pagina 206)

Campo	**Funzione**
Light Direction	Immettere di volta in volta una coordinata x e y per l'angolo di proiezione della proiezione SFP. Questa angolo rappresenta l'angolo di incidenza del raggio laser sul preparato. Fare clic sul pulsante Apply (Applica) per creare la proiezione con il nuovo angolo.
Absorption	Modificare con il cursore il coefficiente di assorbimento . Maggiore è l'impostazione, minori sono i valori calcolati nell'immagine di proiezione. Impostando il coefficiente ad un valore basso, molti pixel nell'immagine di proiezione raggiungono il valore massimo, pertanto le strutture sono sempre più difficilmente distinguibili.
Threshold	Definire un valore di soglia con il cursore. Per la creazione dell'immagine di

	proiezione, i valori di intensità al di sotto di questo valore non vengono considerati.
Rescale to maximum	I valori di intensità dell'immagine vengono normalizzati alle intensità massime consentite. Questo assicura che i grigi dell'immagine di proiezione rilevati rimangano all'interno del campo di valori compreso, per esempio, tra 0 e 255 con 8 bit. Le immagini scure possono così essere schiarite.

Finestra di dialogo Viewer Options, icona Overlay

Struttura della finestra di visualizzazione Experiment Overview
Per aprire la finestra di dialogo Viewer Options (Opzioni visualizzatore), selezionare l'opzione Experiment Overview (Panoramica esperimento) nel menu View (Visualizzazione).
A sinistra dell'interfaccia di comando compare la finestra di visualizzazione Experiment Overview. Nella parte superiore della finestra di visualizzazione, le immagini riprese vengono visualizzate in un albero di directory. Nella parte inferiore si trova la finestra di dialogo Viewer Options. In questa finestra di dialogo si possono effettuare le impostazioni fondamentali per diverse funzioni software. A sinistra vengono visualizzate le icone corrispondenti alle varie funzioni, a destra i relativi registri. Quando si apre la finestra di dialogo, compaiono le icone delle funzioni con le quali si sta correntemente lavorando. Per visualizzare tutte le icone, fare clic sul comando Show all (Mostra tutte).

Nel registro dell'icona Overlay (Sovrapposizione) si possono effettuare le impostazioni opzionali per le seguenti funzioni:

& vedi Visualizzare un'immagine di sovrapposizione (pagina 200)

Nel **registro Overlay** si possono selezionare tre modalità per la creazione di un'immagine di sovrapposizione dai dati grezzi e le relative tabelle di classificazione cromatica:

Color Merging	Funzione
True Color (add RGBs)	I valori dei pixel delle immagini originarie vengono mediati e rappresentati nell'immagine di sovrapposizione.
True Color (add RGBs) with dynamic adjustment	I valori cromatici dei pixel nelle immagini originali vengono mediati, normalizzati ai valori cromatici massimali possibili e rappresentati nell'immagine di sovrapposizione.
Fast (bitwise "OR" RGB)	I valori cromatici dei pixel nelle immagini originali vengono uniti tramite un rapido processo di calcolo in bit e visualizzati nell'immagine di sovrapposizione. & vedi Operazioni booleane (pagina 306)

Coloring	Funzione
Only Red/ Green/ Blue	Per la creazione dell'immagine di sovrapposizione vengono utilizzate sempre le tabelle di classificazione cromatica rosso, verde e blu, a prescindere dalle attuali tabelle colori delle immagini originali.

Finestra di dialogo Viewer Options, icona Scan Progress

Funzione
Per aprire la finestra di dialogo Viewer Options (Opzioni visualizzatore), selezionare l'opzione Experiment Overview (Panoramica esperimento) nel menu View (Visualizzazione).

A sinistra dell'interfaccia di comando compare la finestra di visualizzazione Experiment Overview. Nella parte superiore della finestra di visualizzazione, le immagini riprese vengono visualizzate in un albero di directory. Nella parte inferiore si trova la finestra di dialogo Viewer Options. In questa finestra di dialogo si possono effettuare le impostazioni fondamentali per diverse funzioni software. A sinistra vengono visualizzate le icone corrispondenti alle varie funzioni, a destra i relativi registri. Quando si apre la finestra di dialogo, compaiono le icone delle funzioni con le quali si sta correntemente lavorando. Per visualizzare tutte le icone, fare clic sul comando Show all (Mostra tutte).

Nel registro dell'icona Scan Progress (Corso scansione) si possono effettuare le impostazioni opzionali per le seguenti funzioni:

& vedi Selezionare una modalità di scansione (pagina 153)

Nel **registro Scan Progress** viene visualizzata la modalità di scansione correntemente impostata. Può essere inoltre controllato lo stato di una ripresa sulla base di un'indicazione di andamento.

Finestra di dialogo Viewer Options, icona Surface View

Funzione
Per aprire la finestra di dialogo Viewer Options (Opzioni visualizzatore), selezionare l'opzione Experiment Overview (panoramica esperimento) nel menu View (Visualizzazione).
A sinistra dell'interfaccia di comando compare la finestra di visualizzazione Experiment Overview. Nella parte superiore della finestra di visualizzazione, le immagini riprese vengono visualizzate in un albero di directory. Nella parte inferiore si trova la finestra di dialogo Viewer Options. In questa finestra di dialogo si possono effettuare le impostazioni fondamentali per diverse funzioni software. A sinistra vengono visualizzate le icone corrispondenti alle varie funzioni, a destra i relativi registri. Quando si apre la finestra di dialogo, compaiono le icone delle funzioni con le quali si sta correntemente lavorando. Per visualizzare tutte le icone, fare clic sul comando Show all (Mostra tutte).

Nel registro dell'icona Surface View (Superficie) si possono effettuare le impostazioni opzionali per le seguenti funzioni:

& vedi Creare un'immagine tridimensionale (pagina 213)

Nel **registro Visualization** (Visualizzazione) si può scegliere se la visualizzazione tridimensionale deve essere eseguita come immagine superficiale (Surface), come immagine di reticolo a fili (Wireframe) oppure come isolinee (Isolines), determinando la prospettiva in cui l'immagine tridimensionale va visualizzata:

Render Mode	**Funzione**
Surface	Gli spazi intermedi tra i punti dell'immagine vengono riempiti con superfici.
Wireframe	Tutti i punti dell'immagine vengono collegati con linee, gli spazi intermedi rimangono liberi.
Isolines	I punti dell'immagine, che corrispondono a valori della stessa intensità, vengono

	racchiusi da una curva.

Projection Type	Funzione
Perspective	L'immagine tridimensionale viene mostrata in prospettiva centrale.
Parallel	L'immagine tridimensionale viene mostrata in prospettiva parallela.

Nel **campo Stretch height (factor)** (Campo allungamento altezza/fattore) si ha la possibilità di modificare il fattore di rappresentazione in scala nella direzione z e quindi di allungare o contrarre in altezza l'immagine tridimensionale.

Nel **campo Downsample rate** (Campo livello riduzione di campionamento) la densità di informazioni dell'immagine tridimensionale può essere ridotta per accelerarne l'elaborazione. Con una densità di punti di 1:1, tutti i valori di intensità misurati vengono visualizzati nell'immagine. Con una densità di punti di 1:2, penetrano nell'immagine solo i secondi valori di intensità.

Nel **campo Isoline interval** (Campo intervallo isolinee) si definisce una distanza in µm che deve separare le singole isolinee. In questo modo si può limitare il numero di isolinee dell'immagine tridimensionale.

Nel **campo Isoline detail level** (Campo livello dettagli isolinee) si stabilisce, attraverso l'immissione di un valore limite, di visualizzare solo le isolinee aventi una determinata lunghezza nell'immagine tridimensionale. Vengono così visualizzate solo le isolinee che corrispondono ad un valore di intensità di una determinata frequenza.

Finestra di dialogo Viewer Options, icona Surface Measure

Funzione
Per aprire la finestra di dialogo Viewer Options (Opzioni visualizzatore), selezionare l'opzione Experiment Overview (Panoramica esperimento) nel menu View (Visualizzazione).
A sinistra dell'interfaccia di comando compare la finestra di visualizzazione Experiment Overview. Nella parte superiore della finestra di visualizzazione, le immagini riprese vengono visualizzate in un albero di directory. Nella parte inferiore si trova la finestra di dialogo Viewer Options. In questa finestra di dialogo si possono effettuare le impostazioni fondamentali per diverse funzioni software. A sinistra vengono visualizzate le icone corrispondenti alle varie funzioni, a destra i relativi registri. Quando si apre la finestra di dialogo, compaiono le icone delle funzioni con le quali si sta correntemente lavorando. Per visualizzare tutte le icone, fare clic sul comando Show all (Mostra tutte).

Nel registro dell'icona Surface Measure (Misurazione di superficie) si possono effettuare le impostazioni opzionali per le seguenti funzioni:

& vedi Misurazioni di rugosità lungo un segmento (pagina 260)

Nel **campo Leveling** (livellazione) vengono suggerite delle opzioni per portare in posizione orizzontale, tramite una funzione di adattamento, le curve di misurazione di un profilo di rugosità che mostrano un andamento tendenziale. A tal fine, una funzione di interpolazione lineare (polinomio) viene adattata alla curva di misurazione.

& vedi Fase operativa Process / cartella Materials (pagina)
& vedi Funzione di adattamento per la correzione di andamenti tendenziali

None	Sulla curva di misurazione non viene utilizzata alcuna funzione di adattamento.

Automatic linear	La curva di misurazione viene portata in posizione orizzontale mediante una funzione di adattamento lineare.
Interactive level	La posizione della curva di misurazione viene corretta mediante una funzione di adattamento in modo tale che il segmento compreso tra i due punti di misurazione si trovi in linea orizzontale.
Freeze	La curva di misurazione riposizionata viene bloccata in modo tale che la posizione dei punti di misurazione possa essere di nuovo modificata senza coinvolgere l'adattamento interattivo della curva.

Nel **campo Multipoint Measurement** (Misurazione di più punti) c'è la possibilità di salvare i due punti di misurazione e la differenza di altezza tra i punti stessi.

▶	Fare clic sul pulsante Remember (Ricorda) per salvare i valori. Con il pulsante Clear (Cancella) questi vengono di nuovo cancellati.

Finestra di dialogo Viewer Options, icona Surface Calculation

Funzione
Per aprire la finestra di dialogo Viewer Options (opzioni visualizzatore), selezionare l'opzione Experiment Overview (panoramica esperimento) nel menu View (visualizzazione).
A sinistra dell'interfaccia di comando compare la finestra di visualizzazione Experiment Overview. Nella parte superiore della finestra di visualizzazione, le immagini riprese vengono visualizzate in un albero di directory. Nella parte inferiore si trova la finestra di dialogo Viewer Options. In questa finestra di dialogo si possono effettuare le impostazioni fondamentali per diverse funzioni software. A sinistra vengono visualizzate le icone corrispondenti alle varie funzioni, a destra i relativi registri. Quando si apre la finestra di dialogo, compaiono le icone delle funzioni con le quali si sta correntemente lavorando. Per visualizzare tutte le icone, fare clic sul comando Show all (mostra tutte).

Nel registro dell'icona Surface Calculation (calcolo di superficie) si possono effettuare le impostazioni opzionali per le seguenti funzioni:

& vedi Creare un'immagine topografica

Nel **registro Topography** (Topografia) vengono suggerite diverse opzioni per la creazione di un'immagine topografica. Se i picchi di intensità o i baricentri di intensità di una superficie nell'immagine topografica devono essere interpretati come altezza, selezionare la relativa opzione. Definire il tipo di visualizzazione dell'altezza nell'immagine topografica ed impostare un valore di soglia per le intensità da rappresentare.

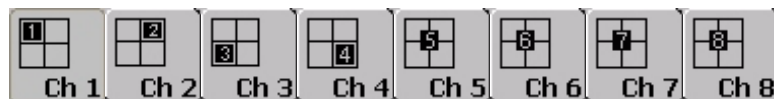
Surface Reconstruction	**Funzione**
Search maximum intensity	Per ogni colonna di punti di scansione analizzata, nell'immagine tipografica viene visualizzato il punto di scansione avente l'intensità massima come riferimento per tutti i valori all'interno della colonna.
Calculate center of mass of intensities	Per ogni colonna di punti di scansione analizzata, nell'immagine tipografica viene visualizzato il baricentro della superficie, limitato dalla curva dei valori di intensità misurati.

Topography Processing	**Funzione**

Invert height	La colonna di punti di scansione viene analizzata in senso inverso: le informazioni sulle altezze vengono invertite e viene visualizzato un negativo dell'immagine topografica.
Level	La posizione orizzontale di una ripresa viene corretta mediante una funzione di interpolazione lineare (polinomio). & vedi Fase operativa Process / cartella Materials (pagina 268)

Threshold	**Funzione**
Spostare il cursore sulla scala oppure immettere un valore numerico.	Le intensità al di sotto del valore di soglia impostato non vengono più considerate per il calcolo dell'immagine topografica.

Visualizzare i canali di rilevamento

Visualizzare il canale di rilevamento 1-8

Funzione

Facendo clic sul tasto Channel 1-8 (Canale 1-8), nella finestra di visualizzazione Viewer vengono visualizzati i dati immagine registrati nel canale di rilevamento 6. Al canale di rilevamento può essere assegnata una delle molte tabelle di classificazione cromatica. Questo è possibile sia nell'immagine finale sia durante la ripresa. A tal fine occorre aprire la finestra di dialogo Select Look-up Tables (Seleziona tabelle di classificazione cromatica); per aprirla ci sono due possibilità:

▶	Fare clic sul tasto Select Look-up Tables.
▶	Tenere il puntatore su un punto a scelta della finestra di visualizzazione Viewer. Fare clic sul tasto destro del mouse. Facendo clic su LUT appare un menu contestuale. Nella finestra di visualizzazione vengono visualizzate le barre colori dei canali di rilevamento attivi. Fare doppio clic sulla barra colori corrispondente.

& vedi Selezionare le tabelle di classificazione cromatica (LUT) (pagina 197)

Questo metodo di attribuzione di tabelle di classificazione cromatica influenza solo la visualizzazione dell'immagine attuale. Non appena si avvia un nuovo processo di scansione, vengono di nuovo utilizzate le tabelle di classificazione cromatica impostate nella finestra di dialogo Beam Path Setting (impostazione percorso del raggio).

& vedi Impostare il percorso del raggio (pagina 140)

Zoomare un'immagine/delle immagini nella finestra di visualizzazione Viewer

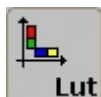
Funzione

Facendo clic sul tasto Display, si apre un campo di elenco in cui è possibile impostare lo zoom grafico. In questo modo si ingrandisce o si riduce l'immagine visualizzata nella finestra di visualizzazione Viewer:

n-1	L'immagine viene ridotta: nell'immagine finale n pixel vengono rappresentati come 1 pixel.
Automatic (automatico)	L'immagine viene visualizzata nel formato originale.
1-n	L'immagine viene ingrandita: nell'immagine finale 1 pixel viene rappresentato come n pixel.

Il Leica Confocal Software dispone di tre funzioni zoom differenti fra loro: lo zoom elettronico, lo zoom tridimensionale e lo zoom grafico.

& vedi Zoomare un'immagine tridimensionale (pagina 215)
& vedi Zoom elettronico (pagina 149)

Selezionare le tabelle di classificazione cromatica (LUT)

Funzione

Con il tasto Look-up Tables (Tabelle di classificazione cromatica) si apre una finestra di dialogo dove ogni volta è possibile attribuire ai canali di rilevamento una tabella di classificazione cromatica. L'impostazione delle tabelle di classificazione cromatica può essere eseguita sia sull'immagine finale che durante la ripresa stessa:

▶	Nel campo Select Channel (Seleziona canale), fare clic sul canale di rilevamento al quale si vuole attribuire una nuova tabella di classificazione cromatica.
▶	Nel campo Select LUT (Seleziona tabella di classificazione cromatica), selezionare la tabella di classificazione cromatica desiderata.
▶	Fare clic sul pulsante Apply (Applica) per controllare il risultato sulla finestra di visualizzazione Viewer.

La finestra di dialogo Select LUT's può essere aperta anche tramite la finestra di visualizzazione Viewer.

▶	Tenere il puntatore su un punto a scelta nella finestra immagine della finestra di visualizzazione Viewer. Quindi, fare clic sul tasto destro del mouse. Facendo clic su LUT appare un menu contestuale.
▶	Nella finestra di visualizzazione si aprono le barre colori dei canali di rilevamento attivi, a destra,

	accanto alla finestra immagine. Fare doppio clic su una delle barre colori.

Caricare una seconda tabella di classificazione cromatica
Tenendo puntato il mouse sulla barra colori interessata, compaiono dei punti di presa sull'estremità superiore e inferiore della barra colori. Con questi punti di presa si può limitare l'attuale tabella di classificazione cromatica ad un determinato campo di intensità e caricare una seconda tabella di classificazione cromatica:

▶	Tirare il punto di presa superiore verso il basso o il punto di presa inferiore verso l'alto.
▶	Fare doppio clic sul campo al di sopra e al di sotto del punto di presa in questione.
▶	Si apre la finestra di dialogo Select LUT's (seleziona tabelle di classificazione cromatica), dove si può selezionare una seconda tabella di classificazione cromatica.
▶	Il campo di intensità superiore e inferiore viene visualizzato nei colori della seconda tabella di classificazione cromatica.

Questo metodo di attribuzione di tabelle di classificazione cromatica influenza solo la visualizzazione dell'immagine attuale. Non appena si avvia un nuovo processo di scansione, vengono di nuovo utilizzate le tabelle di classificazione cromatica impostate nella finestra di dialogo Beam Path Setting (Impostazione percorso del raggio).

& vedi Impostare il percorso del raggio (pagina 140)

Applicazioni tipiche
In linea di principio, la scelta di una tabella di classificazione cromatica adatta ad una determinata applicazione dipende dall'intuito dell'utente. L'esperienza, comunque, dimostra che alcune tabelle di classificazione cromatica si prestano in modo particolare a determinate applicazioni:

Tabella di classificazione cromatica	Applicazione
Green	Si usa normalmente per la ripresa di preparati marcati con FITC, Cy2, DTAF e coloranti fluorescenti simili che emettono nel campo spettrale verde.
Red	Si usa normalmente per la ripresa di preparati marcati con TRITC, Texas Red, Cy3, Rodamin e coloranti fluorescenti simili che emettono nel campo spettrale rosso.
Blue	Si usa normalmente per la ripresa di preparati marcati con coloranti di fluorescenza UV come DAPI o Hoechst oppure coloranti simili che emettono nel campo spettrale blu.
Gray	Si usa normalmente per la visualizzazione di riprese di trasmissione.
P. Color 1	È particolarmente adatto per la visualizzazione di immagini di 12 bit.
P. Color 2, 3, 4, 5, 6	Si usano normalmente per la ripresa di preparati marcati con coloranti fluorescenti ipersensibili al pH o a ioni e per la visualizzazione di serie temporali.
Geo (Land), Geo (Sea) Geo (Land & Sea) R & B	Si raccomandano per la creazione di immagini topografiche, quindi per la rappresentazione di strutture superficiali. In particolare, Geo Land & Sea si presta alla visualizzazione di cavità o livelli.
Glow, Glow (Over), Glow (Under), Glow (Over &	Si consigliano per l'ottimizzazione del contrasto d'immagine (Offset e Gain (Guadagno) dei rivelatori). Glow Over (Intensità sopra) evidenzia le intensità sul margine superiore della tabella in blu, Glow Under (Intensità sotto) mostra le intensità sul margine inferiore della tabella in verde. Glow Over e Under

Under)	(Intensità sopra e sotto) è una combinazione di queste due tabelle cromatiche.
Cyan, Magenta, Yellow	Si consigliano per la stampa di un'immagine. I cosiddetti colori CMY(K) vengono utilizzati per la stampa cromatica su sistemi di stampa. I colori RVB, come le altre tabelle di classificazione cromatica qui utilizzate, vengono usati per la visualizzazione a colori su monitor. Trattandosi in questo caso di due sistemi cromatici diversi, i colori nella visualizzazione CMY(K) possono differenziarsi sensibilmente dalla visualizzazione sul monitor.

Tutte le tabelle di classificazione cromatica sono disponibili anche con corso cromatico inverso, ossia le intensità elevate vengono visualizzate in scuro, quelle basse in chiaro.

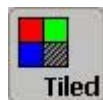
Visualizzare un fotogramma

Funzione

Facendo clic sul tasto Single (Singola), nella finestra di visualizzazione Viewer viene visualizzato un solo canale di rilevamento o più canali di rilevamento in una sola immagine. A seconda di quali altri tasti vengono contemporaneamente attivati, esistono varie possibilità di visualizzazione:

Combinazione tasti	Visualizzazione
Single+ Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	Viene mostrato solo un canale di rilevamento selezionato; con una serie di immagini, viene visualizzata la prima immagine del canale di rilevamento selezionato.
Single + Gallery + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	Vengono visualizzati tutti i fotogrammi di una serie di immagini solo per un canale di rilevamento selezionato.
Single + Overlay + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	Per tutti i canali di rilevamento selezionati viene creata un'unica immagine di sovrapposizione; con una serie di immagini si utilizza ogni volta la prima.
Single + Gallery + Overlay + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	A seconda del numero di fotogrammi di una serie di immagini, vengono create immagini di sovrapposizione per tutti i canali di rilevamento selezionati.

Il tasto Single e il tasto Tiled non possono essere contemporaneamente attivi perché essi sono legati a due funzioni che si escludono a vicenda.

Visualizzare un'immagine multipla

Funzione

Facendo clic sul tasto Tiled (A tasselli), i canali di rilevamento vengono visualizzati separatamente nella finestra di visualizzazione Viewer. A seconda di quali altri tasti vengono contemporaneamente attivati, esistono varie possibilità di visualizzazione:

Combinazione tasti	Visualizzazione
Tiled + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	Tutti i canali di rilevamento selezionati vengono visualizzati separatamente; con una serie di immagini si utilizza ogni volta la

	prima.
Tiled + Gallery + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	Tutti i fotogrammi di una serie di immagini vengono visualizzati separatamente per tutti i canali di rilevamento selezionati.
Tiled + Overlay + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	Tutti i canali di rilevamento selezionati vengono separati e poi visualizzati in un'immagine di sovrapposizione. Con una serie di immagini, si utilizza ogni volta la prima.
Tiled + Gallery + Overlay + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	Tutti i fotogrammi di una serie di immagini vengono divisi per tutti i canali di rilevamento selezionati e poi visualizzati insieme in immagini di sovrapposizione.

Il tasto Tiled e il tasto Single (Singola) non possono essere azionati con un clic contemporaneamente in quanto essi attivano due funzioni che si escludono a vicenda.

Visualizzare una sequenza

Funzione
Facendo clic sul tasto Gallery (Galleria), tutti i fotogrammi di una serie di immagini vengono mostrati nella finestra di visualizzazione Viewer. A seconda di quali altri tasti vengono contemporaneamente attivati, esistono varie possibilità di visualizzazione:

Combinazione tasti	Visualizzazione
Gallery + Single + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	Vengono visualizzati tutti i fotogrammi di una serie di immagini solo per un canale di rilevamento selezionato.
Gallery + Single + Overlay + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	A seconda del numero di fotogrammi di una serie di immagini, vengono create immagini di sovrapposizione per tutti i canali di rilevamento selezionati.
Gallery + Tiled + Channel 1 / 2 / 3 / 4/ 5	Tutti i fotogrammi di una serie di immagini vengono visualizzati separatamente per tutti i canali di rilevamento selezionati.
Gallery + Tiled + Overlay + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	Tutti i fotogrammi di una serie di immagini vengono divisi per tutti i canali di rilevamento selezionati e poi visualizzati insieme in immagini di sovrapposizione.

Visualizzare un'immagine di sovrapposizione

Funzione
Facendo clic sul tasto Overlay (Sovrapposizione), tutti i canali di rilevamento selezionati vengono visualizzati insieme in un'immagine di sovrapposizione nella finestra di visualizzazione Viewer. Al contrario del tasto Overlay rgb, i canali di rilevamento vengono sempre mostrati con le tabelle di classificazione cromatica attuali. A questo scopo, vengono mediati i valori cromatici in pixel. A seconda di quali altri tasti vengono contemporaneamente attivati, esistono varie possibilità di visualizzazione:

Combinazione tasti	Visualizzazione
Overlay + Single + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	Per tutti i canali di rilevamento selezionati viene creata un'unica immagine di sovrapposizione; con una serie di immagini si utilizza ogni volta la prima.
Overlay + Single + Gallery + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	A seconda del numero di fotogrammi di una serie di immagini, vengono create immagini di sovrapposizione per tutti i canali di rilevamento selezionati.
Overlay + Tiled + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	Tutti i canali di rilevamento selezionati vengono divisi e poi visualizzati in un'immagine di sovrapposizione; con una serie di immagini si utilizza ogni volta la prima.
Overlay + Tiled + Gallery + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	Tutti i fotogrammi di una serie di immagini vengono divisi per tutti i canali di rilevamento selezionati e poi visualizzati insieme in immagini di sovrapposizione.

Nella finestra di dialogo Viewer Options (Opzioni visualizzatore) si possono scegliere tre diversi tipi di mescolanza cromatica per la creazione di un'immagine di sovrapposizione:

▶	Nel menu View (Visualizzazione) scegliere l'opzione di visualizzazione Viewer Options.
▶	Fare clic sull'icona Overlay.

& vedi Finestra di dialogo Viewer Options, icona Overlay (pagina 192)

Visualizzare un'immagine di sovrapposizione in RVB

Funzione

Cliccando sul tasto Overlay rvb (Sovrapposizione), tutti i canali di rilevamento selezionati vengono visualizzati insieme in un'immagine di sovrapposizione nella finestra di visualizzazione Viewer. A differenza del tasto Overlay, tutti i canali di rilevamento vengono sempre mostrati con le tabelle di classificazione cromatica Rosso, Verde e Blu (rvb). A seconda di quali altri tasti vengono contemporaneamente attivati, esistono varie possibilità di visualizzazione:

& vedi Visualizzare un'immagine di sovrapposizione (pagina 200)

Combinazione tasti	Visualizzazione
Overlay rvb + Single + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	Per tutti i canali di rilevamento selezionati viene creata un'unica immagine di sovrapposizione; con una serie di immagini si utilizza ogni volta la prima.
Overlay rvb + Single + Gallery + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	A seconda del numero di fotogrammi di una serie di immagini, vengono create immagini di sovrapposizione per tutti i canali di rilevamento selezionati.
Overlay rvb + Tiled + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	Tutti i canali di rilevamento selezionati vengono divisi e poi visualizzati in un'immagine di sovrapposizione; con una serie di immagini si utilizza ogni volta la prima.
Overlay rvb + Tiled + Gallery + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	Tutti i fotogrammi di una serie di immagini vengono divisi per tutti i canali di rilevamento selezionati e poi visualizzati insieme in immagini di sovrapposizione.

Nella finestra di dialogo Viewer Options (Opzioni visualizzatore) si possono scegliere tre diversi tipi di mescolanza cromatica per la creazione di un'immagine di sovrapposizione:

▶	Nel menu View (Visualizzazione) scegliere l'opzione di visualizzazione Viewer Options.
▶	Fare clic sull'icona Overlay.

Rappresentazione di serie immagini

Visualizzare la prima immagine di una serie

Funzione

I fotogrammi ripresi con una serie di immagini possono essere fatti scorrere come sequenza filmata. Fare clic sul tasto First (Prima) per passare alla prima immagine di una serie.

Se si fa clic sul tasto Gallery (Galleria), i tasti First (Prima) e Last (Ultima), Next (Successiva) e Previous (Precedente) e Play/Stop presentano uno sfondo grigio e non possono essere attivati. Con il tasto Gallery si aprono tutti i fotogrammi di una serie di immagini, che quindi non possono essere fatti scorrere come una sequenza filmata.

Visualizzare l'immagine successiva di una serie

Funzione

I fotogrammi ripresi con una serie di immagini possono essere fatti scorrere come sequenza filmata. Per visualizzare l'immagine successiva della serie, fare clic sul tasto Next (Successiva).

Se si fa clic sul tasto Gallery, i tasti First e Last, Next e Previous e Play/Stop presentano uno sfondo grigio e non possono essere attivati. Con il tasto Gallery si aprono tutti i fotogrammi di una serie di immagini, che quindi non possono essere fatti scorrere come una sequenza filmata.

Visualizzare l'immagine precedente in una serie

Funzione

I fotogrammi ripresi con una serie di immagini possono essere fatti scorrere come sequenza filmata. Fare clic sul tasto Previous (Precedente) per visualizzare l'immagine precedente di una serie.

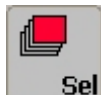
Se si fa clic sul tasto Gallery, i tasti First e Last, Next e Previous e Play/Stop presentano uno sfondo grigio e non possono essere attivati. Con il tasto Gallery si aprono tutti i fotogrammi di una serie di immagini, che quindi non possono essere fatti

scorrere come una sequenza filmata.

Visualizzare l'ultima immagine di una serie

Funzione
I fotogrammi ripresi con una serie di immagini possono essere fatti scorrere come sequenza filmata. Fare clic sul tasto Last per passare all'ultima immagine della serie.

Se si fa clic sul tasto Gallery, i tasti First e Last, Next e Previous e Play/Stop presentano uno sfondo grigio e non possono essere attivati. Con il tasto Gallery si aprono tutti i fotogrammi di una serie di immagini, che quindi non possono essere fatti scorrere come una sequenza filmata.

Visualizzare un'immagine a scelta di una serie

Funzione
Facendo clic sul tasto Selection (Selezione), si apre una finestra di dialogo dove è possibile selezionare immagini a scelta di una serie e rappresentarle nella finestra di visualizzazione Viewer. Sotto la scala viene indicato il numero di fotogrammi della serie da 1 a n, mentre in un campo d'inserimento compare il numero dell'immagine attualmente visualizzata.

▶	Spostando il cursore della scala con il puntatore; l'immagine corrispondente viene immediatamente visualizzata.
▶	Immettere il numero dell'immagine desiderata nel campo d'inserimento e fare clic su Apply.

Avviare e terminare una pellicola

Funzione
I fotogrammi ripresi con una serie di immagini possono essere fatti scorrere come una sequenza filmata. Con il tasto Play/Stop si avvia e si termina questa pellicola. La velocità della pellicola, ossia il numero di fotogrammi per unità temporale, è variabile e può essere impostato nella finestra di dialogo Viewer Options:

▶	Nel menu View (Visualizzazione) scegliere l'opzione di visualizzazione Viewer Options.
▶	Fare clic sull'icona Display e poi sul registro Movie.

& vedi Finestra di dialogo Viewer Options, icona Display (pagina 187)

Facendo clic sul tasto Gallery, i tasti Play/Stop, First e Last, Next e Previous presentano uno sfondo grigio e non possono essere attivati. Con il tasto Gallery si aprono tutti i fotogrammi di una serie di immagini, che quindi non possono essere fatti scorrere come una sequenza filmata.

Visualizzare una sequenza

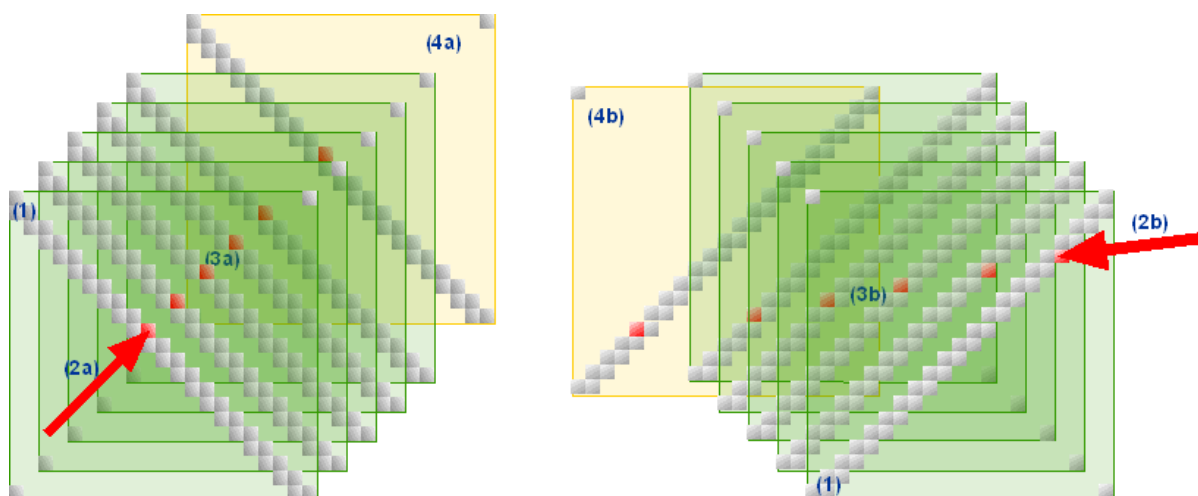
Funzione
Facendo clic sul tasto Gallery, tutti i fotogrammi di una serie di immagini vengono mostrati nella finestra di visualizzazione Viewer. A seconda di quali altri tasti vengono contemporaneamente attivati, esistono varie possibilità di visualizzazione:

Combinazione tasti	Visualizzazione
Gallery + Single + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	Vengono visualizzati tutti i fotogrammi di una serie di immagini solo per un canale di rilevamento selezionato.
Gallery + Single + Overlay + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	A seconda del numero di fotogrammi di una serie di immagini, vengono create immagini di sovrapposizione per tutti i canali di rilevamento selezionati.
Gallery + Tiled + Channel 1 / 2 / 3 / 4/ 5	Tutti i fotogrammi di una serie di immagini vengono visualizzati separatamente per tutti i canali di rilevamento selezionati.
Gallery + Tiled + Overlay + Channel 1 / 2 / 3 / 4 / 5	Tutti i fotogrammi di una serie di immagini vengono divisi per tutti i canali di rilevamento selezionati e poi visualizzati insieme in immagini di sovrapposizione.

Proiezioni

Principio e tipi di proiezioni

Per la ripresa di preparati biologici viene creata una serie di immagini. Ogni fotogramma viene acquisito ad un determinato livello del preparato. Il risultato è un record di dati tridimensionale che riproduce l'intero volume di un preparato. Ogni sezione ottica, ossia ogni fotogramma, mostra solo le informazioni da un unico livello del preparato: le strutture che si estendono attraverso tutto il preparato sono quindi riprodotte parzialmente nelle varie immagini. Per avere una visione complessiva di queste strutture, si utilizzano le proiezioni. Con gli algoritmi delle proiezioni è possibile selezionare le informazioni parziali distribuite tra più fotogrammi, creando un'unica immagine bidimensionale. In questo modo si possono ricostruire strutture continue.

Condizione di base per l'applicazione di una proiezione, quindi, è una serie di immagini, che può essere costituita da sezioni xy orizzontali o da sezioni xz verticali. Per una migliore comprensione del funzionamento di una proiezione, è utile figurarsi la serie di immagini come una pila di fotogrammi sovrapposti. Ogni fotogramma è a sua volta composto da singoli punti di scansione del laser. Questi punti o Voxel (1), vale a dire i valori di intensità misurati in ogni fotogramma, sono sovrapposti l'uno all'altro. Durante la creazione di una proiezione, i punti di scansione sovrapposti lungo l'asse di proiezione (2a, 2b) vengono analizzati attraverso tutte le sezioni ottiche. Per ognuno di queste colonne di punti di scansione (3a, 3b) viene poi rappresentato in un'immagine di proiezione bidimensionale (4a, 4b) il valore di intensità che soddisfa il criterio di selezione, o un valore calcolato come riferimento per tutte le intensità all'interno della colonna.

(2a) Proiezione con asse di proiezione invariabile
(2b) Proiezione con asse di proiezione variabile

Proiezioni con asse di proiezione invariabile o variabile
Il tipo di asse di proiezione suddivide le varie proiezioni disponibili nel Leica Confocal Software in due gruppi principali. Esistono proiezioni con un asse invariabile e proiezioni con un asse variabile. Per le prime, si tratta di proiezioni ortogonali: l'asse di proiezione è sempre l'asse ottico perpendicolare alla pila di immagini (asse z con sezioni xy orizzontali e asse y con sezioni xz verticali). Al contrario, per il secondo tipo di proiezioni l'asse può essere scelto liberamente. In entrambi i gruppi sono di volta in volta disponibili gli stessi 3 tipi di proiezioni (tranne la proiezione SFP).

I tipi di proiezione

Tipo di proiezione	Asse di proiezione invariabile	Asse di proiezione variabile

Proiezione massima	fix Max.	3D Max
Proiezione media	fix Avg.	3D Avg.
Proiezione trasparente	fix Trans.	3D Trans.
Proiezione SFP	----------	3D SFP

I tipi di proiezione possono essere attivati, da un lato, con il rispettivo tasto, dall'altro, nella finestra di dialogo Image Tool (Strumento per l'immagine). Se la funzione viene attivata tramite il tasto, l'immagine di proiezione è solo una visualizzazione temporanea su monitor. Se viene invece attivata nella finestra di dialogo, l'immagine di proiezione viene creata come un nuovo file nell'attuale esperimento:

▶	Le proiezioni con asse di proiezione invariabile si trovano nella finestra di dialogo Image Tool/ pulsante 3D/ icona Orthogonal Projection (Proiezione ortogonale).
▶	Le proiezioni con asse di proiezione variabile si trovano nella finestra di dialogo Image Tool/ pulsante 3D/ icona Projections and Animations (Proiezioni ed animazioni).
▶	La proiezione SFP si trova nella finestra di dialogo Image Tool/ pulsante 3D/ icona SFP.

Proiezione massima
Nella proiezione massima si parte dai valori di intensità massimi rilevanti per la ricostruzione di una struttura. Pertanto, con questo tipo di proiezione, si ricerca il valore massimo in ogni colonna di punti di scansione, e questo poi viene visualizzato nell'immagine di proiezione bidimensionale come riferimento per l'intera colonna:

$$Ip = Max(Vn)$$

dove Ip è il pixel nell'immagine di proiezione e Vn il Voxel analizzato

Proiezione media
Con la proiezione media, ogni valore di intensità deve affluire nell'immagine di proiezione con la stessa ponderazione. Pertanto, per questo tipo di proiezione, viene calcolata la media aritmetica di tutti i valori di intensità in ogni colonna di punti di scansione, e poi la stessa viene rappresentata nell'immagine di proiezione bidimensionale come riferimento per l'intera colonna:

$$Ip = \frac{\sum_{n=0}^{N-1} V_n}{N}$$

dove IP è il pixel nell'immagine di proiezione, Vn il voxel analizzato e N il numero totale di voxel

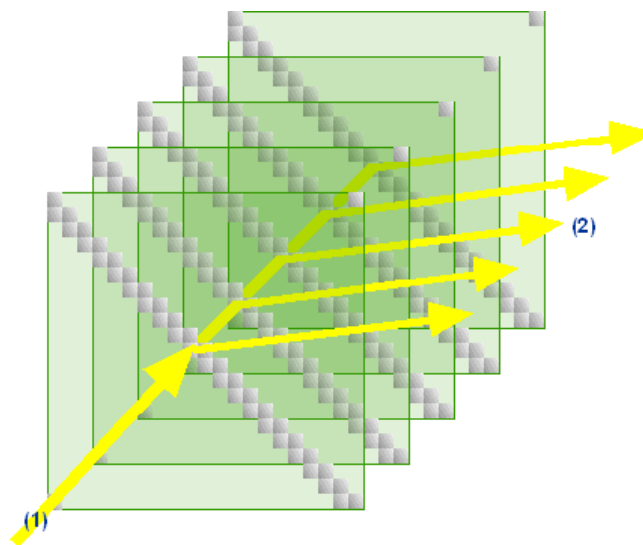
Proiezione trasparente
Nella proiezione trasparente, tutti i valori di intensità devono confluire allo stesso modo nell'immagine di proiezione. Al contrario della proiezione media, le intensità dei vari fotogrammi vengono ponderate diversamente: i valori di intensità dei fotogrammi inferiori della pila di immagini vengono considerati meno rispetto alle intensità delle immagini superiori. Pertanto, con la proiezione trasparente, viene calcolata una media ponderata di tutti i valori di intensità in ogni colonna di punti di scansione, e questa viene poi visualizzata nell'immagine bidimensionale come riferimento per l'intera colonna:

$$I_0 = V_0$$
$$I_1 = (T_n \times \alpha) \times I_0 + V_1$$
$$I_2 = (T_n \times \alpha) \times I_1 + V_2$$
$$\ldots$$
$$I_n = (T_n \times \alpha) \times I_{n-1} + V_n$$

dove In è il pixel nell'immagine di proiezione, Tn = 1 - (Vn / Vmax) α la normalizzazione, a il fattore di trasparenza variabile, In-1 il valore dell'ultimo voxel calcolato e Vn il voxel attualmente analizzato.

Il calcolo dell'immagine di proiezione inizia con il fotogramma inferiore della pila di immagini e termina con quello superiore. La ponderazione delle intensità si compone di due fattori.
Il primo fattore Tn scaturisce dal rapporto tra il valore di intensità di volta in volta misurato e l'intensità massima possibile (normalizzazione). Questo fattore assicura che la fascia dei grigi di un'immagine compresa, ad esempio, tra 0 e 255 a 8 bit non venga superata.
Il secondo fattore di trasparenza, impostabile dall'utente, α (0 < < α1) determina la ponderazione dell'ultimo valore di intensità misurato. Quanto maggiore è il fattore di trasparenza impostato, tanto maggiore è il flusso delle intensità dal livello inferiore della pila nell'immagine di proiezione.

Proiezione SFP (processo di fluorescenza simulato), simulazione matematica di un processo di fluorescenza

Con questo tipo di proiezione, il processo di assorbimento di luce laser e di emissione di luce fluorescente legato alla microscopia a fluorescenza viene simulato in un preparato con un'operazione aritmetica. Il processo consta di due fase di calcolo.

Nella prima fase, viene simulato il raggio laser (1) che penetra attraverso il campione e si affievolisce. Si parte da un sorgente luminosa laterale che si imbatte nei voxel della pila di immagini.
L'attenuazione del raggio incidente mentre attraversa la pila di immagini viene considerata con la seguente espressione:

$$I_{n+1} = I_n \, (1 - \alpha \cdot \frac{V_n}{V_{max}})$$

dove In+1 è l'intensità residua dopo l'assorbimento nel n. voxel, In l'intensità della luce incidente nel n. voxel, il coefficiente di assorbimento della luce laser nel campione, Vn l'intensità nel voxel e Vmax l'intensità voxel massima. Il quoziente Vn / Vmax corrisponde alla normalizzazione.

Per ogni voxel, sulla base delle intensità rilevate In, viene calcolata l'intensità luminosa VIn = In x Vn, e questa viene poi temporaneamente salvata in una tabella (In = intensità della luce incidente nel voxel n, Vn = intensità del voxel n). Il calcolo viene eseguito per l'intera pila di immagini, ossia per tutti i voxel nella direzione dell'irradiazione incidente di un intervallo. Si ottiene così una tabella di intensità luminose.

Nella seconda fase, si calcola la fluorescenza emessa (2) in base alle intensità luminose. L'intensità del pixel nell'immagine di proiezione come riferimento per i voxel nella direzione visiva dell'osservatore viene calcolata tramite la formula ricorsiva:

$$I_{n+1} = I_n \left(1 - \alpha \cdot \frac{V_n}{V_{max}}\right) + V_{In}$$

rappresenta il coefficiente di assorbimento della luce fluorescente nel campione e VIn l'intensità luminosa del n. voxel calcolata nella prima fase.

Proiezione massima di una pila di immagini con un asse di proiezione invariabile

Funzione

Con il tasto Fix. Max. (Proiez. max.) si inizia una proiezione massima. Per questa funzione, l'asse di proiezione è sempre l'asse ortogonale (asse z per le sezioni orizzontali xy e asse y per le sezioni verticali xz).

Condizione di base per l'applicazione di una proiezione è una pila di immagini, quindi una serie di sezioni orizzontali xy o sezioni verticali xz. Durante la creazione di una proiezione, i punti di scansione dei fotogrammi, che sono sovrapposti lungo l'asse di proiezione, vengono analizzati attraverso tutte le sezioni ottiche. Per ognuna di queste colonne di punti di scansione viene poi rappresentato nell'immagine di proiezione bidimensionale il valore di intensità massimo come riferimento per tutte le intensità all'interno della colonna.

& vedi Principio e tipi di proiezioni (pagina 206)

▶	Facendo clic sul tasto Fix. Max. Si crea una proiezione massima dell'attuale pila di immagini che poi viene rappresentata nella finestra di visualizzazione Viewer.
▶	In qualsiasi momento si può tornare all'immagine originale facendo clic sul tasto Original (originale).

Nella finestra di dialogo Viewer Options (Opzioni visualizzatore) si può inoltre impostare un valore di soglia (Threshold) e ridimensionare il campo di valori di intensità presenti nell'immagine (scaling).

& vedi Finestra di dialogo Viewer Options, icona Projections (pagina 189)

Una proiezione massima può essere attivata, da un lato, con il tasto Fix.Max., dall'altro, nella fase operativa Process/ cartella Extended Focus (Fuoco esteso). Se la funzione viene attivata tramite il tasto, l'immagine di proiezione è solo una visualizzazione temporanea su monitor.

& vedi Fase operativa Process / cartella Extended Focus (pagina 230)
& vedi Creare un esperimento (pagina 257)

Si tenga presente la differenza che esiste tra una proiezione massima e un'immagine topografica creata da picchi di intensità. In una proiezione massima, tutti i picchi di intensità vengono direttamente assegnati ad un valore cromatico. In un'immagine topografica di picchi di intensità, questi ultimi vengono prima attribuiti alla posizione z reale del punto di scansione interessato e poi codificati cromaticamente.

& vedi Creare un'immagine topografica (pagina 212)

Proiezione massima di una pila di immagini con un asse di proiezione variabile

(opzionale, vedi capitolo Pacchetti software opzionali, 3D, pagina 285 e segg.)

Proiezione media di una pila di immagini con un asse di proiezione invariabile

Funzione

Con il tasto Fix. Avg. (Proiez. media) si inizia una proiezione media. Per questa funzione, l'asse di proiezione è sempre l'asse ortogonale (asse z per le sezioni orizzontali xy e asse y per le sezioni verticali xz).

Condizione di base per l'applicazione di una proiezione è una pila di immagini, quindi una serie di sezioni orizzontali xy o sezioni verticali xz. Durante la creazione di una proiezione, i punti di scansione dei fotogrammi, che sono sovrapposti lungo l'asse di proiezione, vengono analizzati attraverso tutte le sezioni ottiche. Per ognuna di queste colonne di punti di scansione, viene calcolata la media aritmetica di tutti i valori di intensità che poi viene rappresentata nell'immagine di proiezione bidimensionale come riferimento per l'intera colonna.

& vedi Principio e tipi di proiezioni (pagina 206)

▶	Facendo clic sul tasto Fix. Avg., si crea una proiezione media dell'attuale pila di immagini che viene poi rappresentata nella finestra di visualizzazione Viewer.
▶	In qualsiasi momento si può tornare all'immagine originale facendo clic sul tasto Original (Originale).

Nella finestra di dialogo Viewer Options (Opzioni visualizzatore) si può inoltre impostare un valore di soglia (Threshold) e ridimensionare il campo di valori di intensità presenti nell'immagine (scaling).

& vedi Finestra di dialogo Viewer Options, icona Projections (pagina 189)

Una proiezione media può essere attivata, da un lato, con il tasto Fix.Avg., dall'altro, nella fase operativa Process/ cartella Extended Focus (Fuoco esteso). Se la funzione viene attivata tramite il tasto, l'immagine di proiezione è solo una visualizzazione temporanea su monitor.

& vedi Fase operativa Process / cartella Extended Focus (pagina 230)
& vedi Creare un esperimento (pagina 257)

Proiezione media di una pila di immagini con un asse di proiezione variabile

(opzionale, vedi capitolo Pacchetti software opzionali, 3D, pagina 285 e segg.)

Proiezione trasparente di una pila di immagini con un asse di proiezione invariabile

Funzione
Con il tasto Fix. Trans. (Proiez. trasl.) si inizia una proiezione trasparente. Per questa funzione, l'asse di proiezione è sempre l'asse ortogonale (asse z per le sezioni orizzontali xy e asse y per le sezioni verticali xz).

Condizione di base per l'applicazione di una proiezione è una pila di immagini, quindi una serie di sezioni orizzontali xy o sezioni verticali xz. Durante la creazione di una proiezione, i punti di scansione dei fotogrammi, che sono sovrapposti lungo l'asse di proiezione, vengono analizzati attraverso tutte le sezioni ottiche. Per ognuna di queste colonne di punti di scansione si calcola poi una media ponderata di tutti i valori di intensità, e questa viene rappresentata nell'immagine di proiezione bidimensionale come riferimento per l'intera colonna.

& vedi Principio e tipi di proiezioni (pagina 206)

L'utente può modificare la ponderazione dei punti di scansione per il calcolo della media impostando un fattore appropriato (transparent factor) nella finestra di dialogo Viewer Options (opzioni visualizzatore). Inoltre, è possibile impostare anche un valore di soglia (threshold) e ridimensionare il campo di intensità presente nell'immagine (scaling).

& vedi Finestra di dialogo Viewer Options, icona Projections (pagina 189)

▶	Facendo clic sul tasto Fix. Trans. si crea una proiezione trasparente dell'attuale pila di immagini, che poi viene rappresentata nella finestra di visualizzazione Viewer.
▶	In qualsiasi momento si può tornare all'immagine originale facendo clic sul tasto Original (Originale).

Una proiezione trasparente può essere attivata, da un lato, con il tasto Fix.Trans., dall'altro, nella fase operativa Process / cartella Extended Focus. Se la funzione viene attivata tramite il tasto, l'immagine di proiezione è solo una visualizzazione temporanea su monitor.

& vedi Fase operativa Process / cartella Extended Focus (pagina 230)
& vedi Creare un esperimento (pagina 257)

Proiezione trasparente di una pila di immagini con un asse di proiezione variabile

(opzionale, vedi capitolo Pacchetti software opzionali, 3D, pagina 285 e segg.)

Creare una proiezione SFP di una pila di immagini

(opzionale, vedi capitolo Pacchetti software opzionali, 3D, pagina 285 e segg.)

Creare un'immagine topografica

Funzione
Con la funzione Topography (Topografia), si possono selezionare determinati dati di intensità da una pila di immagini, quindi una serie di sezioni xy o xz, e trasmetterli in un'immagine topografica bidimensionale. I punti di scansione (voxel) sovrapposti lungo l'asse z vengono analizzati attraverso tutte le sezioni ottiche. Per ciascuna di queste colonne di punti di scansione, viene visualizzato nell'immagine topografica solo il valore di intensità che soddisfa il criterio di selezione, come riferimento per tutti i valori all'interno della colonna.

La selezione può avvenire in base all'intensità massima (maximum intensity) oppure secondo il baricentro di una superficie (center of mass) delle intensità misurate. Se nell'immagine topografica devono essere visualizzati i picchi di intensità, si seleziona solo il punto di scansione in corrispondenza del quale è stata misurata l'intensità massima. Per il calcolo del baricentro della superficie, si considera un valore medio di tutti i punti di scansione sovrapposti (il baricentro della superficie limitata dalla curva delle intensità misurate).

Il picco di intensità o il baricentro della superficie viene poi assegnato all'effettiva posizione z del punto di scansione specifico, e infine codificato cromaticamente. In base a questa assegnazione, l'immagine topografica riproduce **l'effettiva struttura superficiale** del preparato. Nell'impostazione standard, le strutture superiori sono chiare, le strutture più profonde sono scure.

L'impostazione del criterio di selezione per l'immagine topografica può essere effettuata nella finestra di dialogo Viewer Options:

▶	Nel menu View (Visualizzazione) scegliere l'opzione di visualizzazione Viewer Options.
▶	Fare clic sull'icona Surface Calculation (Calcolo della superficie) per visualizzare il registro Topography.

& vedi Finestra di dialogo Viewer Options, icona Surface Calculation (pagina 195)

In una seconda fase, l'immagine topografica può essere rappresentata in un grafico tridimensionale con la funzione Immagine tridimensionale.

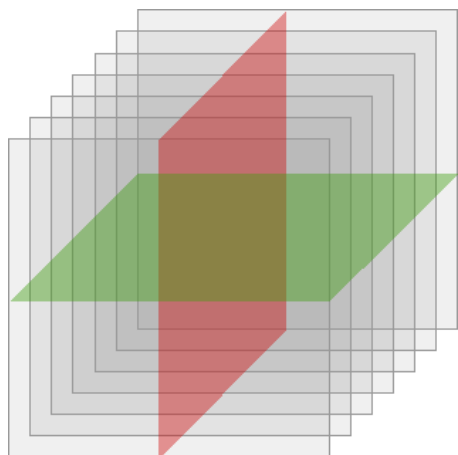
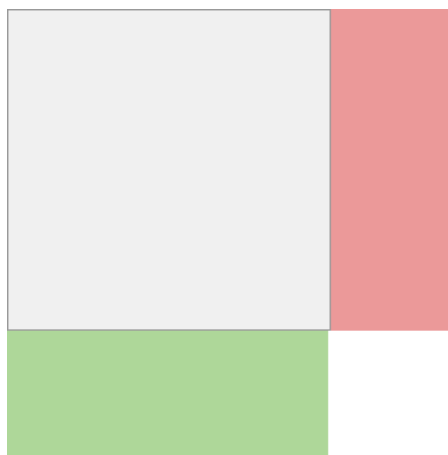
& vedi Creare un'immagine tridimensionale (pagina 213)

Applicazioni tipiche
La rappresentazione dei dati immagine in un'immagine topografica risulta molto informativa soprattutto per le indagini scientifiche sui materiali. Per l'applicazione di funzioni di quantificazione, la funzione topografica è essenziale.

Visualizzare un'immagine originale

Funzione
Per annullare un'immagine di proiezione o un'immagine topografica, fare clic sul tasto Original (Originale). Nella finestra di visualizzazione Viewer vengono mostrati di nuovo i dati grezzi registrati dell'immagine.

Creare viste in sezione di una serie immagini

Funzione
Facendo clic sul tasto Sectioning (Sezionamento), verranno create due viste in sezione del set di dati immagini attivo, che verranno aperte sul margine inferiore destro del set di dati immagini. Questa funzione può essere sempre applicata ad un solo canale di rilevamento.

Viste in sezione di una serie immagini

Rappresentazione delle viste in sezione nella finestra di visualizzazione Viewer

Creazione di immagini tridimensionali

Creare un'immagine tridimensionale

Funzione
Con il tasto 3D View (Visualizzazione) è possibile visualizzare tridimensionalmente un record di dati

bidimensionale. Con una serie di immagini, si utilizza sempre il record di dati della serie correntemente visualizzato nella finestra di visualizzazione Viewer. Nell'immagine tridimensionale è possibile visualizzare una sezione xy o una sezione xz da dati grezzi oppure un'immagine di risultato, ad esempio una topografia o una proiezione. A seconda della grandezza rappresentata o calcolata nell'immagine di uscita, durante la creazione dell'immagine tridimensionale viene eseguita una mappatura dei valori di intensità o di altezza sull'asse z dell'immagine stessa.

*La rappresentazione spaziale dell'intensità in un'immagine tridimensionale può essere facilmente legata alla topografia del preparato. Si tenga comunque presente che **la struttura superficiale effettiva** di un preparato può essere rappresentata solo dopo aver creato un'immagine topografica.*

& vedi Creare un'immagine topografica (pagina 212)

L'immagine tridimensionale può essere creata in tre modalità di rappresentazione: come superficie (Surface), come reticolo a fili (Wireframe) o come isolinea (Isolines). Impostare una di queste modalità nella finestra di dialogo Viewer Options:

▶	Nel menu View (Visualizzazione) scegliere l'opzione di visualizzazione Viewer Options.
▶	Fare clic sull'icona Surface View e poi sul registro Visualization.

& vedi Finestra di dialogo Viewer Options, icona Surface View (pagina 193)

Per ogni canale di rilevamento viene generata un'immagine tridimensionale separata, pertanto non è possibile creare un'unica immagine tridimensionale da un'immagine di sovrapposizione (tasto Overlay).

Ruotare un'immagine tridimensionale

Funzione
Con il tasto Rotate (Ruota) è possibile ruotare un'immagine tridimensionale in tutte e tre le direzioni spaziali. Si tenga presente che l'immagine tridimensionale viene ruotata attorno ad un punto fisso che si trova al centro della figura.

▶	Tenere il puntatore su un punto a scelta dell'immagine tridimensionale.
▶	Fare clic sul tasto sinistro del mouse e tenerlo premuto.
▶	Muovere il puntatore nella direzione in cui si desidera ruotare l'immagine tridimensionale.

Mentre si ruota l'immagine tridimensionale, la risoluzione dell'immagine diminuisce leggermente per velocizzare l'operazione legata a questa funzione. Una volta rilasciato

il tasto sinistro del mouse, l'immagine viene nuovamente mostrata nella definizione impostata in precedenza.

In alternativa a questo metodo di rotazione manuale di un'immagine tridimensionale, la finestra di dialogo Viewer Options offre anche la possibilità di immettere un angolo di rotazione per i tre assi spaziali:

▶	Nel menu View (Visualizzazione) scegliere l'opzione di visualizzazione Viewer Options.
▶	Fare clic sull'icona 3D e poi sul registro Navigation (Navigazione).
▶	Nel campo Rotation (Rotazione) si può immettere l'angolo di rotazione per tutti e tre gli assi.

& vedi Finestra di dialogo Viewer Options, icona 3D (pagina 186)

Spostare un'immagine tridimensionale

Funzione
Con il tasto Move (Sposta) si può spostare un'immagine tridimensionale:

▶	Tenere il puntatore su un punto a scelta dell'immagine tridimensionale.
▶	Fare clic sul tasto sinistro del mouse e tenerlo premuto.
▶	Muovere il puntatore nella direzione in cui si desidera spostare l'immagine tridimensionale.

Mentre si sposta l'immagine tridimensionale, la definizione dell'immagine diminuisce leggermente per velocizzare l'operazione legata a questa funzione. Una volta rilasciato il tasto sinistro del mouse, l'immagine viene nuovamente mostrata nella definizione impostata in precedenza.

In alternativa a questo metodo di spostamento manuale di un'immagine tridimensionale, la finestra di dialogo Viewer Options offre anche la possibilità di immettere i valori delle coordinate per il posizionamento dell'immagine:

▶	Nel menu View (Visualizzazione) scegliere l'opzione di visualizzazione Viewer Options.
▶	Fare clic sull'icona 3D e poi sul registro Navigation (Navigazione).
▶	Nel campo Translation (Traslazione) si possono modificare i valori delle coordinate per l'asse x e l'asse z.

& vedi Finestra di dialogo Viewer Options, icona 3D (pagina 186)

Zoomare un'immagine tridimensionale

Funzione
Con il tasto Zoom, un'immagine tridimensionale può essere ingrandita o ridotta in modo continuamente proporzionale. Trattandosi soltanto di un ridimensionamento dell'immagine creata,

questa funzione di zoom non consente una risoluzione migliore.

Per ingrandire l'immagine tridimensionale	Nella finestra immagine della finestra di visualizzazione Viewer fare clic su un punto a scelta e, tenendo premuto il tasto sinistro, tirare la freccia del mouse **verso il bordo inferiore**.
Per ridurre l'immagine tridimensionale	Nella finestra immagine della finestra di visualizzazione Viewer fare clic su un punto a scelta e, tenendo premuto il tasto sinistro, tirare la freccia del mouse **verso il bordo superiore**.

Mentre l'immagine tridimensionale viene zoomata, la sua definizione diminuisce leggermente per velocizzare l'operazione legata a questa funzione. Una volta rilasciato il tasto sinistro del mouse, l'immagine viene nuovamente mostrata nella definizione impostata in precedenza.

In alternativa a questo metodo di zoom manuale di un'immagine tridimensionale, la finestra di dialogo Viewer Options offre anche la possibilità di modificare lo zoom mediante l'immissione di valori numerici:

▶	Nel menu View (Visualizzazione) scegliere l'opzione di visualizzazione Viewer Options.
▶	Quindi, fare clic sull'icona 3D.
▶	Nel registro Navigation (Navigazione), è possibile modificare lo zoom cambiando il valore y nel campo Translation (Traslazione).

& vedi Finestra di dialogo Viewer Options, icona 3D (pagina 186)

Il Leica Confocal Software dispone di tre funzioni zoom differenti fra loro: lo zoom tridimensionale, lo zoom elettronico e lo zoom grafico.

& vedi Zoom elettronico (pagina 149)
& vedi Finestra di dialogo Viewer Options, icona Display (pagina 187)

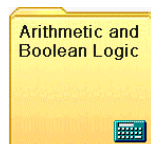
Visualizzare la correlazione di canali di rilevamento

vedi Pacchetti software opzionali / Multicolor (pagina 274e segg.)

Elaborazione dati

Proiezioni tridimensionali e animazioni di serie di immagini

(opzionale, vedi capitolo Pacchetti software opzionali, 3D, pagina 285 e segg.)

Operazioni aritmetiche e booleane

In questo capitolo si trovano i seguenti temi:

- Struttura e controllo della fase operativa Process
- Navigazione: Arithmetic and Boolean Logic\ Image and Image
- Navigazione: Arithmetic and Boolean Logic\ Image and Constant

Struttura e controllo della fase operativa Process

Facendo clic sul simbolo di freccia Process (Processo), la normale struttura dell'interfaccia di comando viene completamente modificata. Tutti i tasti di funzione degli altri campi pulsanti/fasi operative si disattivano. Sul lato sinistro viene mostrata la finestra di visualizzazione Experiment Overview (Panoramica esperimento) **(1)** con gli esperimenti aperti. Più in basso si trova la finestra di navigazione **(2)** con l'albero di directory di tutte le funzioni disponibili in questa fase operativa. Al centro dell'interfaccia di comando compaiono 10 grandi zone pagina **(3)** che comprendono 10 moduli. Al di sopra di queste zone pagina si trova un campo di aiuto **(4)**, dove, tenendo il puntatore su una determinata zona pagina, è possibile visualizzare una breve spiegazione del relativo modulo.

▶	Fare clic sulla zona pagina contenente il modulo desiderato. Ad ogni livello di navigazione, puntando il mouse su una specifica zona pagina, si visualizza una spiegazione dei moduli in alto, nel campo di aiuto.
▶	Nei livelli di navigazione successivi, scegliere ogni volta una zona pagina fino a raggiungere la funzione desiderata con la relativa finestra di dialogo all'ultimo livello.
▶	Nella finestra di navigazione si può scegliere direttamente una funzione facendo clic sulla cartella corrispondente.

Nella riga di menu in alto a destra vengono suggeriti i seguenti tasti **(5)**:

▶	Fare clic sul tasto Back (Indietro) per ritornare all'ultimo livello di navigazione visualizzato.
▶	Fare clic sul tasto Forward (Avanti) per visualizzare il livello che si era selezionato prima di aver azionato con un clic il tasto Back.
▶	Fare clic sul tasto Up (Su) per portarsi al livello gerarchicamente superiore.
▶	Fare clic sul tasto Reset (Ripristina) per riportare le variabili modificate all'ultima impostazione.
▶	Per uscire dalla fase operativa Process (Processo), fare clic sul simbolo di freccia di un'altra fase operativa (per esempio, Acquire).

Nell'estremità inferiore di ogni finestra di dialogo si trovano questi due pulsanti:

▶	Fare clic sul pulsante Preview (Anteprima) per eseguire la funzione selezionata e visualizzare l'immagine finale a destra, nella finestra di anteprima.
▶	Fare clic sul tasto Apply (Applica) per applicare la funzione selezionata al record di dati immagine attivo, visualizzare l'immagine finale nella finestra di visualizzazione Viewer e creare un nuovo file nell'esperimento attivo.

Navigazione: Arithmetic and Boolean Logic\ Image and Image
Operazioni aritmetiche e logiche con due record di dati immagine

Condizione per l'esecuzione di operazioni aritmetiche sono dimensioni uguali o un rapporto 1/n di entrambi i record di dati. Dimensioni uguali significa che due immagini devono avere lo stesso formato in x e y, e due pile di immagini anche lo stesso numero di fotogrammi (z). Si ha poi un rapporto 1/n quando, per esempio, un fotogramma viene compensato con ogni (n) fotogramma di una pila di immagini.

Zona pagina Boolean Logic

& vedi Operazioni booleane (pagina 306)

▶	Nella finestra di visualizzazione Experiment Overview (panoramica esperimento), selezionare il primo record di dati immagine facendo doppio clic sul file.
▶	Nel campo Second Source Image (seconda immagine sorgente), selezionare il secondo record di dati immagine per l'operazione di calcolo.
▶	Scegliere l'operatore AND per collegare le rappresentazioni binarie dei pixel delle due immagini selezionate con l'operatore logico AND. Ciò significa che il pixel nell'immagine finale conserverà il valore 1 se entrambi i pixel presentano il valore 1, altrimenti si registra il valore 0.
	Questo operatore booleano consente di ottenere risultati utili collegando un'immagine ad una maschera binaria. Laddove i pixel dell'immagine trovano il pixel della maschera con il valore 1, il pixel viene visualizzato nell'immagine finale. I campi definiti dalla maschera vengono quindi stampati fuori dall'immagine.
▶	Scegliere l'operatore OR per collegare le rappresentazioni binarie dei pixel delle due immagini selezionate con l'operatore logico OR. Ciò significa che il pixel nell'immagine finale conserverà il valore 1 se almeno uno dei due pixel presenta il valore 1, altrimenti si registra il valore 0.
	Questo operatore booleano consente di ottenere risultati utili: 1. Collegando due maschere binarie; l'immagine finale è una combinazione delle due maschere. 2. Collegando un'immagine ad una maschera binaria; l'immagine finale è un'immagine in cui viene visualizzata la maschera. 3. Collegando due immagini. Rispetto all'immagine di sovrapposizione, qui vengono sovrapposti valori di intensità puri. In questo caso NON ha luogo un'addizione cromatica RVB. & vedi Visualizzare un'immagine di sovrapposizione (pagina 200)
▶	Scegliere l'operatore XOR per collegare le rappresentazioni binarie dei pixel delle due immagini selezionate all'operatore logico XOR. Ciò significa che il pixel nell'immagine finale conserverà il valore 1 se entrambi pixel presentano valori differenti, altrimenti si registra il valore 0.
	Questo operatore booleano consente di ottenere risultati utili creando e collegando due maschere binarie di immagini. Laddove i pixel delle due immagini sono differenti, il pixel viene visualizzato nell'immagine finale.

Zona pagina Arithmetic with World Coordinates
Zona pagina Arithmetic with Pixel Values

Selezionando Arithmetic with World Coordinates (aritmetica con coordinate universali), le operazioni aritmetiche si servono di coordinate universali, quali, ad esempio, la posizione z, il momento o la lunghezza d'onda. Se si è selezionato Arithmetic with Pixel Values (aritmetica con valori pixel), si utilizzano i grigi normalizzati all'intervallo compreso tra 0 e 255 con 8 bit, o tra 0 e 4095 con 12 bit.

▶	Nella finestra di visualizzazione Experiment Overview (panoramica esperimento), selezionare il primo record di dati immagine facendo doppio clic sul file.
▶	Nel campo Second Source Image (seconda immagine sorgente), selezionare il secondo record di dati immagine per l'operazione di calcolo.
▶	Selezionare Addition (Addizione) per addizionare i valori d'intensità delle due immagini selezionate secondo la formula: pixel (immagine finale) = pixel (First Source Image) + pixel (Second Source Image).
▶	Selezionare Subtraction (Sottrazione) per sottrarre i valori d'intensità delle due immagini selezionate secondo la formula: pixel (immagine finale) = pixel (First Source Image) – pixel (Second Source Image).
▶	Selezionare Multiplication (Moltiplicazione) per moltiplicare i valori d'intensità delle due immagini selezionate secondo la formula: pixel (immagine finale) = pixel (First Source Image) x pixel (Second Source Image).
▶	Selezionare Division (Divisione) per dividere i valori d'intensità delle due immagini selezionate secondo la formula: pixel (immagine finale) = pixel (First Source Image) / pixel (Second Source Image).
▶	Selezionare Min per utilizzare in ciascun pixel dell'immagine finale il valore minimo di ciascuna delle due immagini selezionate secondo la formula: pixel (immagine finale) = MIN (pixel (First

	Source Image); pixel (Second Source Image)).
▶	Selezionare Max per utilizzare in ciascun pixel dell'immagine finale il valore massimo di ciascuna delle due immagini selezionate secondo la formula: pixel (immagine finale) = MAX (pixel (First Source Image); pixel (Second Source Image)).
▶	Selezionare Average per utilizzare in ciascun pixel dell'immagine finale il valore medio di ciascuna delle due immagini selezionate secondo la formula: pixel (immagine finale) = 1/2 x (pixel (First Source Image + pixel Second Source Image).
▶	Selezionando 12 Bit Output nel campo Output Option (Opzione di output), ogni pixel dell'immagine finale viene codificato con 12 bit, vale a dire che il salvataggio dei risultati avviene in un campo di valori di [0..4095].
▶	Se si devono utilizzare i valori dei risultati, fare clic sulla casella di selezione Absolute Value (valore assoluto). Da risultati negativi se ne ottengono così dei positivi.

Solo per Arithmetic with Pixel Values

▶	Fare clic sulla casella di selezione Cut at Maximum (Taglia al massimo) per troncare i valori che, dopo il calcolo, risultano esterni al relativo campo. I valori inferiori a 0 vengono impostati a 0. Tutti i valori maggiori di 255 con immagini di 8 bit, o maggiori di 4095 con immagini di 12 bit, vengono impostati al valore 255 o 4095.
▶	Fare clic sulla casella di selezione Rescale (Ridimensiona) per normalizzare tutti i valori di intensità dell'immagine alle intensità massime possibili. Vengono definiti i valori estremi. Il valore minimo viene assegnato allo 0; il valore massimo viene attribuito, in caso di immagini di 8 bit, al valore 255, in caso di immagini di 12 bit, al valore 4095. Questo assicura che i valori pixel rilevati dell'immagine finale si mantengano nell'ambito del campo di valori specifico.

Navigazione: Arithmetic and Boolean Logic\ Image and Constant
Operazioni aritmetiche e logiche con un record di dati immagine e una costante

Condizione per l'esecuzione di operazioni aritmetiche sono dimensioni uguali o un rapporto 1/n di entrambi i record di dati. Dimensioni uguali significa che due immagini devono avere lo stesso formato in x e y, e due pile di immagini anche lo stesso numero di fotogrammi (z). Si ha poi un rapporto 1/n quando, per esempio, un fotogramma viene compensato con ogni (n) fotogramma di una pila di immagini.

Zona pagina Boolean Logic

& vedi Operazioni booleane (pagina 306)

▶	Nel campo Constant (Costante), immettere un valore per la costante. Nella finestra di visualizzazione Experiment Overview (Panoramica esperimento), selezionare il record di dati immagine da elaborare facendo doppio clic sul file.
▶	Scegliere l'operatore AND per collegare le rappresentazioni binarie dei pixel della costante e dell'immagine con l'operatore logico AND. Ciò significa che il pixel nell'immagine finale conserverà il valore 1 se entrambi i pixel presentano il valore 1, altrimenti si registra il valore 0.
▶	Scegliere l'operatore OR per collegare le rappresentazioni binarie dei pixel della costante e dell'immagine con l'operatore logico OR. Ciò significa che il pixel nell'immagine finale conserverà il valore 1 se almeno uno dei due pixel presenta il valore 1, altrimenti si registra il valore 0.
▶	Scegliere l'operatore XOR per collegare le rappresentazioni binarie dei pixel della costante e dell'immagine con l'operatore logico XOR. Ciò significa che il pixel nell'immagine finale conserverà il valore 1 se entrambi pixel presentano valori differenti, altrimenti si registra il valore 0.

Zona pagina Arithmetic with World Coordinates
Zona pagina Arithmetic with Pixel Values

Selezionando Arithmetic with World Coordinates (aritmetica con coordinate universali), le operazioni aritmetiche si servono di coordinate universali, quali, ad esempio, la posizione z, il momento o la lunghezza d'onda. Se si è selezionato Arithmetic with Pixel Values (aritmetica con valori pixel), si utilizzano i grigi normalizzati all'intervallo compreso tra 0 e 255 con 8 bit, o tra 0 e 4095 con 12 bit.

▶	Nel campo Constant (Costante), immettere un valore per la costante. Nella finestra di visualizzazione Experiment Overview (Panoramica esperimento), selezionare il record di dati immagine da elaborare facendo doppio clic sul file.
▶	Nel campo Constant (Costante), immettere un valore per la costante. Il record di dati immagine è automaticamente il record di dati immagine attivo nella finestra di visualizzazione Viewer.
▶	Selezionare Addition (Addizione) per addizionare la costante espressa in pixel ai valori d'intensità dell'immagine selezionata secondo la formula: pixel (immagine finale) = pixel (Source Image) + costante.
▶	Selezionare Subtraction per sottrarre la costante espressa in pixel dai valori d'intensità dell'immagine selezionata secondo la formula: pixel (immagine finale) = pixel (Source Image) – costante.
▶	Selezionare Multiplication (Moltiplicazione) per moltiplicare la costante espressa in pixel per i valori d'intensità dell'immagine selezionata secondo la formula: pixel (immagine finale) = pixel (Source Image) x costante.
▶	Selezionare Division (Divisione) per dividere i valori d'intensità dell'immagine selezionata per la costante secondo la formula: pixel (immagine finale) = pixel (Source Image) / costante.
▶	Selezionare Min per utilizzare per ciascun pixel dell'immagine finale il valore minimo sia dell'immagine selezionata sia della costante secondo la formula: pixel (immagine finale) = MIN (pixel (Source Image); costante).
▶	Selezionare Max per utilizzare per ciascun pixel dell'immagine finale il valore massimo sia dell'immagine selezionata sia della costante secondo la formula: pixel (immagine finale) = MAX (pixel (Source Image); costante).
▶	Selezionare Average (Media) per utilizzare per ciascun pixel dell'immagine finale il valore medio sia dell'immagine selezionata sia della costante secondo la formula: pixel (immagine finale) = 1/2 x (pixel (Source Image) + costante).
▶	Selezionando 12 Bit Output nel campo Output Option (Opzione di output), ogni pixel dell'immagine finale viene codificato con 12 bit, vale a dire che il salvataggio dei risultati avviene in un campo di valori di [0..4095].
▶	Se si devono utilizzare i valori dei risultati, fare clic sulla casella di selezione Absolute Value (Valore assoluto). Da risultati negativi se ne ottengono così dei positivi.

Solo per Arithmetic with Pixel Values

▶	Fare clic sulla casella di selezione Cut at Maximum (Taglia al massimo) per troncare i valori che, dopo il calcolo, risultano esterni al relativo campo. I valori inferiori a 0 vengono impostati a 0. Tutti i valori maggiori di 255 con immagini di 8 bit, o maggiori di 4095 con immagini di 12 bit, vengono impostati al valore 255 o 4095.
▶	Fare clic sulla casella di selezione Rescale (Ridimensiona) per normalizzare tutti i valori di intensità dell'immagine alle intensità massime possibili. Vengono definiti i valori estremi. Il valore minimo viene assegnato allo 0; il valore massimo viene attribuito, in caso di immagini di 8 bit, al valore 255, in caso di immagini di 12 bit, al valore 4095. Questo assicura che i valori pixel rilevati dell'immagine finale si mantengano nell'ambito del campo di valori specifico.

Conversione della risoluzione di immagini in bit

In questo capitolo si trovano i seguenti temi:

- Struttura e controllo della fase operativa Process
- Navigazione: Conversion\ Bit Depth Conversion

Struttura e controllo della fase operativa Process

Facendo clic sul simbolo di freccia Process (Processo), la normale struttura dell'interfaccia di comando viene completamente modificata. Tutti i tasti di funzione degli altri campi pulsanti/fasi operative si disattivano. Sul lato sinistro viene mostrata la finestra di visualizzazione Experiment Overview (panoramica esperimento) **(1)** con gli esperimenti aperti. Più in basso si trova la finestra di navigazione **(2)** con l'albero di directory di tutte le funzioni disponibili in questa fase operativa. Al centro dell'interfaccia di comando compaiono 10 grandi zone pagina **(3)** che comprendono 10 moduli. Al di sopra di queste zone pagina si trova un campo di aiuto **(4)**, dove, tenendo il puntatore su una determinata zona pagina, è possibile visualizzare una breve spiegazione del relativo modulo.

▶	Fare clic sulla zona pagina contenente il modulo desiderato. Ad ogni livello di navigazione, puntando il mouse su una specifica zona pagina, si visualizza una spiegazione dei moduli in alto, nel campo di aiuto.
▶	Nei livelli di navigazione successivi, scegliere ogni volta una zona pagina fino a raggiungere la funzione desiderata con la relativa finestra di dialogo all'ultimo livello.
▶	Nella finestra di navigazione si può scegliere direttamente una funzione facendo clic sulla cartella corrispondente.

Nella riga di menu in alto a destra vengono suggeriti i seguenti tasti **(5)**:

▶	Fare clic sul tasto Back (Indietro) per ritornare all'ultimo livello di navigazione visualizzato.
▶	Fare clic sul tasto Forward (Avanti) per visualizzare il livello che si era selezionato prima di aver azionato con un clic il tasto Back.
▶	Fare clic sul tasto Up (Su) per portarsi al livello gerarchicamente superiore.

▶	Fare clic sul tasto Reset (Ripristina) per riportare le variabili modificate all'ultima impostazione.
▶	Per uscire dalla fase operativa Process (Processo), fare clic sul simbolo di freccia di un'altra fase operativa (per esempio, Acquire).

Nell'estremità inferiore di ogni finestra di dialogo si trovano questi due pulsanti:

▶	Fare clic sul pulsante Preview (Anteprima) per eseguire la funzione selezionata e visualizzare l'immagine finale a destra, nella finestra di anteprima.
▶	Fare clic sul tasto Apply (Applica) per applicare la funzione selezionata al record di dati immagine attivo, visualizzare l'immagine finale nella finestra di visualizzazione Viewer e creare un nuovo file nell'esperimento attivo.

Navigazione: Bit Depth Conversion
Convertire immagini di 8 bit di intensità in immagini di 12 bit di intensità e viceversa

▶	Nella finestra di visualizzazione Experiment Overview (Panoramica esperimento), selezionare il record di dati immagine da elaborare facendo doppio clic sul file.
▶	Nel campo Source (Sorgente) viene indicata l'intensità di bit dell'immagine selezionata.
▶	Nel campo New Resolution (Nuova risoluzione) selezionare l'intensità di bit in cui deve essere convertito il record di dati immagine.

Collegamento o divisione di particolari di immagine, immagini e serie di immagini

In questo capitolo si trovano i seguenti temi:
- Struttura e controllo della fase operativa Process
- Navigazione: Editing\ Merging
- Navigazione: Editing\ Separation

Struttura e controllo della fase operativa Process

Facendo clic sul simbolo di freccia Process (Processo), la normale struttura dell'interfaccia di comando viene completamente modificata. Tutti i tasti di funzione degli altri campi pulsanti/fasi operative si disattivano. Sul lato sinistro viene mostrata la finestra di visualizzazione Experiment Overview (panoramica esperimento) **(1)** con gli esperimenti aperti. Più in basso si trova la finestra di navigazione **(2)** con l'albero di directory di tutte le funzioni disponibili in questa fase operativa. Al centro dell'interfaccia di comando compaiono 10 grandi zone pagina **(3)** che comprendono 10 moduli. Al di sopra di queste zone pagina si trova un campo di aiuto **(4)**, dove, tenendo il puntatore su una determinata zona pagina, è possibile visualizzare una breve spiegazione del relativo modulo.

▶	Fare clic sulla zona pagina contenente il modulo desiderato. Ad ogni livello di navigazione, puntando il mouse su una specifica zona pagina, si visualizza una spiegazione dei moduli in alto, nel campo di aiuto.
▶	Nei livelli di navigazione successivi, scegliere ogni volta una zona pagina fino a raggiungere la funzione desiderata con la relativa finestra di dialogo all'ultimo livello.
▶	Nella finestra di navigazione si può scegliere direttamente una funzione facendo clic sulla cartella corrispondente.

Nella riga di menu in alto a destra vengono suggeriti i seguenti tasti **(5)**:

▶	Fare clic sul tasto Back (Indietro) per ritornare all'ultimo livello di navigazione visualizzato.
▶	Fare clic sul tasto Forward (Avanti) per visualizzare il livello che si era selezionato prima di aver azionato con un clic il tasto Back.
▶	Fare clic sul tasto Up (Su) per portarsi al livello gerarchicamente superiore.
▶	Fare clic sul tasto Reset (Ripristina) per riportare le variabili modificate all'ultima impostazione.
▶	Per uscire dalla fase operativa Process (Processo), fare clic sul simbolo di freccia di un'altra fase operativa (per esempio, Acquire).

Nell'estremità inferiore di ogni finestra di dialogo si trovano questi due pulsanti:

▶	Fare clic sul pulsante Preview (Anteprima) per eseguire la funzione selezionata e visualizzare l'immagine finale a destra, nella finestra di anteprima.
▶	Fare clic sul tasto Apply (Applica) per applicare la funzione selezionata al record di dati immagine attivo, visualizzare l'immagine finale nella finestra di visualizzazione Viewer e creare un nuovo file nell'esperimento attivo.

Navigazione: Editing\ Merging
Unire più immagini o record di dati in un'unica immagine o in un unico record di dati

Registro Amplitude
Adattamento di diverse risoluzioni di bit e altre impostazioni per il calcolo dell'immagine conclusiva

▶	Nella finestra di visualizzazione Experiment Overview (Panoramica esperimento), selezionare il primo record di dati immagine <u>facendo doppio clic</u> sul file.
▶	Nel campo Second Source Image (Seconda immagine sorgente), selezionare il secondo record di dati immagine per l'operazione di calcolo.
▶	Nel campo Amplitude Image 1/2 Min., impostare il valore di intensità minimo. Per record di dati con grigi, questo valore è «0». Per record di dati con coordinate spaziali viene indicato il minimo effettivo. Il minimo può quindi essere regolato in modo da adattare reciprocamente record di dati rappresentati su scale diverse.
	Se si unisce un record di dati con un piccolo intervallo di intensità ad un record di dati che

	possiede un'ampia gamma di intensità, il primo viene visualizzato in modo più scuro rispetto al secondo. Conformando il minimo di entrambi i record di dati, questi vengono rappresentati in scala in modo tale che i rispettivi valori di intensità entrino nell'immagine di unione in ugual misura.
▶	Nel campo Amplitude Image 1/2 Max., impostare il valore di intensità massimo. Per record di dati con grigi, questo valore è «255», per dati di 8 bit, e «4095», per dati di 12 bit. Per record di dati con coordinate spaziali viene indicato il massimo effettivo. Il massimo può quindi essere regolato in modo da adattare reciprocamente record di dati rappresentati su scale diverse.
	Se si unisce un record di dati con un piccolo intervallo di intensità ad un record di dati che possiede un'ampia gamma di intensità, il primo viene visualizzato in modo più scuro rispetto al secondo. Conformando il massimo di entrambi i record di dati, questi vengono rappresentati in scala in modo tale che i rispettivi valori di intensità entrino nell'immagine di unione in ugual misura.
▶	Nel campo Result (Risultato), definire la risoluzione grafica dell'immagine di unione. Una risoluzione di 8 bit può rappresentare 256 diversi gradi di intensità; una risoluzione di 12 bit può rappresentarne 4096.
▶	Se nel campo Result è selezionata l'opzione Maximum Value (Valore massimo), per il calcolo dello specifico pixel dell'immagine di unione si utilizza ogni volta il pixel più chiaro delle due immagini da unire.
▶	Se nel campo Result è selezionata l'opzione Average Value (Valore medio), per il calcolo dello specifico pixel dell'immagine di unione si utilizza ogni volta la media aritmetica delle due immagini da unire.
	Se due immagini molto diverse vengono calcolate in un'immagine di unione tramite il processo di mediatura, lo sfondo nero dell'immagine provoca una riduzione della sua luminosità.

Registro x, y, z, t, la
Definizione della disposizione spaziale delle immagini di uscita nell'immagine finale PRIMA dell'unione

▶	Nel campo Image 1 e Image 2 (Immagine 1 e Immagine 2), immettere nel campo d'inserimento Shift (spostamento) la posizione (x / y / z / t / λ) dell'immagine di uscita nell'immagine di unione. Di solito questo valore è «0». Un valore > 0 ha quindi senso nel momento in cui, ad esempio, si debba mostrare una riduzione di una delle due immagini di uscita in una determinata posizione dell'altra immagine di uscita. Questa funzione si rivela utile anche con serie d'immagini laterali, nel modo in cui compaiono nel Biomapping (mappatura biologica), ad esempio. & vedi Esempio di spostamento di un'immagine nell'immagine finale (pagina **Error! Bookmark not defined.**)
▶	Nel campo Image 1 e Image 2 (Immagine 1 e Immagine 2), immettere nel campo d'inserimento Size (dimensione) la grandezza delle dimensioni (x / y / z / t / λ) dell'immagine di uscita nell'immagine di unione.
▶	Selezionando la casella di selezione Append (Accoda), il secondo record di dati viene collocato accanto al primo. La direzione della collocazione è legato alla selezione o meno di questa funzione nella casella di selezione del registro x, y o z. La selezione contemporanea di questa funzione nei diversi registri per x, y e z, sposta la seconda immagine di uscita o in una sola dimensione o in più dimensioni.
▶	Nel campo Result (Risultato) si può indicare dopo quale pixel l'immagine di unione è conclusa.
	Alla base di questa definizione c'è il seguente: *per determinare le dimensioni dell'immagine di unione vengono utilizzate lunghezze assolute. Ora, se i due record di dati da unire presentano le stesse dilatazioni lineari, ma un diverso numero di pixel (dovuto ad un formato di scansione*

	differente), si deve stabilire se per l'immagine di unione debba essere determinante il numero di pixel o la lunghezza complessiva che ne risulta.
▶	Selezionando l'opzione Best Fit (Adatta al meglio) nel campo Result (Risultato), per calcolare l'immagine finale il software usa il seguente procedimento: Per entrambe le immagini si calcola a quale larghezza corrisponde un singolo pixel: µm/Pixel. Se la differenza di questa grandezza tra le due immagini è minore di un fattore 2, in questo procedimento verrà utilizzata la risoluzione grafica maggiore (cioè un valore µm/Pixel minore) per l'immagine finale. Se la variazione di risoluzione grafica tra le immagini di uscita è maggiore di un fattore 2, per calcolare l'immagine finale si utilizzerà la risoluzione minore (cioè un valore µm/Pixel maggiore). Il numero di pixel dell'immagine finale (Element Number) diviso per la lunghezza totale da come risultato la risoluzione dell'immagine finale.
	 Alla base di questa definizione c'è il seguente: *per determinare le dimensioni dell'immagine di unione vengono utilizzate lunghezze assolute. Ora, se i due record di dati da unire presentano le stesse dilatazioni lineari, ma un diverso numero di pixel (dovuto ad un formato di scansione differente), si deve stabilire se per l'immagine di unione debba essere determinante il numero di pixel o la lunghezza complessiva che ne risulta.*

& vedi Selezionare un formato di scansione (pagina 152)

Registro ch
Definizione dell'unione di immagini con un numero diverso di canali di rilevamento

▶	Per unire due immagini o record di dati aventi un numero diverso di canali di rilevamento, occorre definire nel campo Image 1 (Immagine 1) a partire da quale numero di canale dell'immagine di unione debbano essere inseriti i canali dell'immagine di uscita 1.
▶	Per unire due immagini o record di dati aventi un numero diverso di canali di rilevamento, occorre definire nel campo Image 2 (Immagine 2) a partire da quale numero di canale dell'immagine di unione debbano essere inseriti i canali dell'immagine di uscita 2.
▶	Selezionando la casella di selezione, le due immagini di uscita vendono distribuite su diversi canali dell'immagine di unione.

Navigazione: Editing\ Separation

Estrapolare singole immagini o particolari d'immagini da un record di dati

▶	Nella finestra di visualizzazione Experiment Overview (Panoramica esperimento), selezionare il record di dati immagine da elaborare facendo doppio clic sul file.

Campo Dimension Selection (Selezione dimensione)

▶	Nel campo d'inserimento ch vengono visualizzati i canali di rilevamento dell'immagine o della serie di immagini. Selezionare i canali di rilevamento in cui devono essere estrapolati il particolare dell'immagine o le singole immagini.
▶	Nel campo d'inserimento y viene visualizzato il numero di pixel in y, che dipende dal formato di scansione. Nei campi d'inserimento Start y e End y indicare il numero di pixel da estrapolare. Con il pulsante R, le immissioni possono essere annullate.
▶	Nel campo d'inserimento x viene visualizzato il numero di pixel in x, che dipende dal formato di scansione. Nei campi d'inserimento Start x e End x indicare il numero di pixel da estrapolare. Con il pulsante R, le immissioni possono essere annullate.
▶	Nel campo d'inserimento z viene mostrato il numero di fotogrammi di una serie di immagini. Nei campi d'inserimento Start z e End z indicare il numero di immagini da estrapolare. Con il pulsante R, le immissioni possono essere annullate.
▶	Nel campo d'inserimento Step z / y / x, è possibile inserire un intervallo all'interno di una dimensione. Immettendo, ad esempio, un 2 nel campo d'inserimento Step z (Intervallo z), viene sempre estratta ogni seconda immagine.

Esempi

▶	Se si vogliono estrarre tutte le immagini di un canale di rilevamento da una serie di immagini, fare clic sul canale da estrapolare nel campo d'inserimento ch senza modificare i valori dei campi d'inserimento delle altre dimensioni.
▶	Se si vogliono estrarre singole immagini come un unico insieme da una serie di immagini, immettere i valori corrispondenti nei campi d'inserimento Start z e End z senza modificare i valori nei campi d'inserimento delle altre dimensioni.
▶	Se si vuole estrarre un particolare di tutte le immagini di una serie, definire la grandezza del particolare nei campi d'inserimento Start x, End x e Start y, End y, senza cambiare i valori nei campi d'inserimento per z.

Impostazione di luminosità, contrasto e correzione di gamma

In questo capitolo si trovano i seguenti temi:

- Struttura e controllo della fase operativa Process
- Navigazione: Enhancement\ Contrast and Brightness
- Navigazione: Enhancement\ Gamma Correction

Struttura e controllo della fase operativa Process

Process

Facendo clic sul simbolo di freccia Process (Processo), la normale struttura dell'interfaccia di comando viene completamente modificata. Tutti i tasti di funzione degli altri campi pulsanti/fasi operative si disattivano. Sul lato sinistro viene mostrata la finestra di visualizzazione Experiment Overview (panoramica esperimento) **(1)** con gli esperimenti aperti. Più in basso si trova la finestra di navigazione **(2)** con l'albero di directory di tutte le funzioni disponibili in questa fase operativa. Al centro dell'interfaccia di comando compaiono 10 grandi zone pagina **(3)** che comprendono 10 moduli. Al di sopra di queste zone pagina si trova un campo di aiuto **(4)**, dove, tenendo il puntatore su una determinata zona pagina, è possibile visualizzare una breve spiegazione del relativo modulo.

▶	Fare clic sulla zona pagina contenente il modulo desiderato. Ad ogni livello di navigazione, puntando il mouse su una specifica zona pagina, si visualizza una spiegazione dei moduli in alto, nel campo di aiuto.
▶	Nei livelli di navigazione successivi, scegliere ogni volta una zona pagina fino a raggiungere la funzione desiderata con la relativa finestra di dialogo all'ultimo livello.
▶	Nella finestra di navigazione si può scegliere direttamente una funzione facendo clic sulla cartella corrispondente.

Nella riga di menu in alto a destra vengono suggeriti i seguenti tasti **(5)**:

▶	Fare clic sul tasto Back (Indietro) per ritornare all'ultimo livello di navigazione visualizzato.
▶	Fare clic sul tasto Forward (Avanti) per visualizzare il livello che si era selezionato prima di aver azionato con un clic il tasto Back.
▶	Fare clic sul tasto Up (Su) per portarsi al livello gerarchicamente superiore.
▶	Fare clic sul tasto Reset (Ripristina) per riportare le variabili modificate all'ultima impostazione.
▶	Per uscire dalla fase operativa Process (Processo), fare clic sul simbolo di freccia di un'altra fase operativa (per esempio, Acquire).

Nell'estremità inferiore di ogni finestra di dialogo si trovano questi due pulsanti:

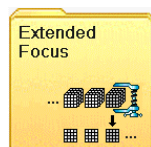
▶	Fare clic sul pulsante Preview (Anteprima) per eseguire la funzione selezionata e visualizzare l'immagine finale a destra, nella finestra di anteprima.
▶	Fare clic sul tasto Apply (Applica) per applicare la funzione selezionata al record di dati immagine attivo, visualizzare l'immagine finale nella finestra di visualizzazione Viewer e creare un nuovo file nell'esperimento attivo.

Navigazione: Enhancement\ Brightness and Contrast
Impostazione di luminosità e contrasto
Quando si modifica la luminosità dell'immagine, i punti chiari, i punti scuri e i gradi di luminosità intermedi dell'immagine vengono schiariti in ugual misura. Con il contrasto, si varia il rapporto tra i punti chiari e i punti scuri dell'immagine.

▶	Nella finestra di visualizzazione Experiment Overview (Panoramica esperimento), selezionare il record di dati immagine da elaborare facendo doppio clic sul file.
▶	Per immagini multicanale, scegliere la casella di selezione Lock Channels (Blocca canali) per effettuare tutte le modifiche per tutti i canali contemporaneamente e nella stessa misura.
▶	Per immagini che non sfruttano l'intera banda di dinamica, selezionare la casella di selezione Linear Model (Modello lineare). Selezionando la casella, si crea un rapporto lineare tra la luminosità dell'immagine di uscita e dell'immagine finale. Per sapere se un'immagine sfrutta l'intera banda di dinamica a disposizione, è sufficiente creare un istogramma dell'immagine. Se l'istogramma non si estende su tutto il range di intensità (vedi valore minimo e massimo), la banda di dinamica non viene sfruttata del tutto. & vedi Calcolare un istogramma (pagina 240) Se si hanno immagini di cui si vogliono evidenziare in modo più marcato i gradi di intensità intermedi, scegliere il modello non lineare (casella Linear Model non selezionata).
▶	Nel campo Channel Adjustment (Regolazione canale), modificare la luminosità dell'immagine finale con il cursore Brightness (luminosità). Se il cursore si trova esattamente al centro, immagine di uscita e immagine finale hanno la medesima luminosità. Se il cursore viene spostato dal centro verso destra, l'immagine finale diventa più chiara dell'immagine di uscita. Se il cursore viene spostato dal centro verso sinistra, l'immagine finale diventa più scura dell'immagine di uscita.
▶	Nel campo Channel Adjustment, modificare il contrasto dell'immagine finale con il cursore Contrast (Contrasto). Se il cursore si trova esattamente al centro, immagine di uscita e immagine finale hanno esattamente lo stesso contrasto. Se il cursore viene spostato dal centro verso destra, l'immagine finale ha un contrasto più forte dell'immagine di uscita. Se il cursore viene spostato dal centro verso sinistra, l'immagine finale ha un contrasto più debole dell'immagine di uscita.

Navigazione: Enhancement\ Gamma Correction
Impostazione dei gradi di luminosità intermedi (correzione di gamma)
Con la correzione di gamma, la conversione del contrasto dell'immagine di uscita nel contrasto dell'immagine finale viene influenzata in modo non lineare. La correzione di gamma ha effetto solo sui gradi di luminosità di un'immagine intermedi, mentre le aree dell'immagine molto chiare e molto scure rimangono invariate.

▶	Nella finestra di visualizzazione Experiment Overview, selezionare il record di dati immagine da elaborare facendo doppio clic sul file.
▶	Per immagini multicanale, scegliere la casella di selezione Lock Channels per effettuare tutte le modifiche per tutti i canali contemporaneamente e nella stessa misura.
▶	Nel campo Channel Adjustment, modificare i gradi di luminosità intermedi dell'immagine finale con il cursore. Se il cursore si trova esattamente al centro, immagine di uscita e immagine finale hanno la medesima luminosità. Se il cursore viene spostato dal centro verso destra, i gradi di luminosità intermedi diventano più chiari. Se il cursore viene spostato dal centro verso sinistra, i gradi di luminosità intermedi diventano più scuri.

Fuoco ampliato dalle proiezioni di pile di immagini su un fotogramma

In questo capitolo si trovano i seguenti temi:

- Struttura e controllo della fase operativa Process
- Navigazione: Extended Focus\ Average Projection, Maximum Projection, Transparent Projection

Struttura e controllo della fase operativa Process

Facendo clic sul simbolo di freccia Process (Processo), la normale struttura dell'interfaccia di comando viene completamente modificata. Tutti i tasti di funzione degli altri campi pulsanti/fasi operative si disattivano. Sul lato sinistro viene mostrata la finestra di visualizzazione Experiment Overview (Panoramica esperimento) **(1)** con gli esperimenti aperti. Più in basso si trova la finestra di navigazione **(2)** con l'albero di directory di tutte le funzioni disponibili in questa fase operativa. Al centro dell'interfaccia di comando compaiono 10 grandi zone pagina **(3)** che comprendono 10 moduli. Al di sopra di queste zone pagina si trova un campo di aiuto **(4)**, dove, tenendo il puntatore su una determinata zona pagina, è possibile visualizzare una breve spiegazione del relativo modulo.

▶	Fare clic sulla zona pagina contenente il modulo desiderato. Ad ogni livello di navigazione, puntando il mouse su una specifica zona pagina, si visualizza una spiegazione dei moduli in alto, nel campo di aiuto.
▶	Nei livelli di navigazione successivi, scegliere ogni volta una zona pagina fino a raggiungere la funzione desiderata con la relativa finestra di dialogo all'ultimo livello.
▶	Nella finestra di navigazione si può scegliere direttamente una funzione facendo clic sulla cartella corrispondente.

Nella riga di menu in alto a destra vengono suggeriti i seguenti tasti **(5)**:

▶	Fare clic sul tasto Back (Indietro) per ritornare all'ultimo livello di navigazione visualizzato.
▶	Fare clic sul tasto Forward (Avanti) per visualizzare il livello che si era selezionato prima di aver

	azionato con un clic il tasto Back.
▶	Fare clic sul tasto Up (Su) per portarsi al livello gerarchicamente superiore.
▶	Fare clic sul tasto Reset (Ripristina) per riportare le variabili modificate all'ultima impostazione.
▶	Per uscire dalla fase operativa Process (Processo), fare clic sul simbolo di freccia di un'altra fase operativa (per esempio, Acquire).

Nell'estremità inferiore di ogni finestra di dialogo si trovano questi due pulsanti:

▶	Fare clic sul pulsante Preview (Anteprima) per eseguire la funzione selezionata e visualizzare l'immagine finale a destra, nella finestra di anteprima.
▶	Fare clic sul tasto Apply (Applica) per applicare la funzione selezionata al record di dati immagine attivo, visualizzare l'immagine finale nella finestra di visualizzazione Viewer e creare un nuovo file nell'esperimento attivo.

Navigazione: Extended Focus\ Average Projection, Maximum Projection, Transparent Projection
Creare un'immagine di proiezione lungo l'asse ortogonale (asse z per le sezioni orizzontali xy e asse y per le sezioni verticali xz)

& vedi Principio e tipi di proiezioni (pagina 206)

▶	Nella finestra di visualizzazione Experiment Overview (Panoramica esperimento), selezionare il record di dati immagine da elaborare facendo doppio clic sul file.
▶	Selezionare uno dei tre tipi di proiezione: Proiezione media (Average Projection), Proiezione massima (Maximum Projection), Proiezione trasparente (Transparent Projection).

Registro Options (Opzioni)

▶	Nel campo Projection Direction (Direzione proiezione), stabilire su quale dimensione far eseguire la proiezione. Scegliere [z] con serie spaziali, [t] con serie temporali o [λ] con serie lambda, per creare la proiezione da tutte le immagini di un canale di rilevamento, quindi, ad esempio, dall'immagine 1 all'immagine 10 nel canale di rilevamento 1. Scegliere [ch] per creare la proiezione da una determinata immagine in tutti i canali di rilevamento, quindi, ad esempio, dall'immagine 1 nel canale di rilevamento 1 e dall'immagine 1 nel canale di rilevamento 2.
▶	Fare clic su Rescale (Ridimensiona) nel campo Options per normalizzare i valori di intensità dell'immagine alle intensità massime possibili durante la creazione dell'immagine di proiezione. Questo assicura che i grigi dell'immagine di proiezione rilevati rimangano all'interno del campo di valori compreso, per esempio, tra 0 e 255 con 8 bit. Le immagini scure possono così essere schiarite.
▶	Se si fa clic su Invert (Inverti) nel campo Options, l'asse di proiezione viene riflesso. Il calcolo dell'immagine di proiezione avviene quindi nella direzione opposta. Questa funzione è utile, soprattutto con microscopi inversi, per adattare il calcolo dell'immagine di proiezione al cammino ottico inverso della luce laser.
▶	Muovere il cursore nel campo Threshold (Soglia) per definire un valore di soglia. Per la creazione dell'immagine di proiezione, i valori di intensità al di sotto di questo valore non vengono considerati.

Registro Factor (solo per proiezioni trasparenti)

& vedi Principio e tipi di proiezioni (pagina 206)

▶	Il registro Factor (Fattore) viene mostrato solo se è stata selezionata la proiezione trasparente. Con il cursore si modifica il fattore di trasparenza α. Maggiore è il fattore impostato, maggiore è il flusso delle intensità dal livello inferiore della pila di immagini nell'immagine di proiezione.

I tre tipi di proiezione possono essere anche attivati direttamente tramite il relativi tasti (Fix Proj / Fix Max / Fix Avg / Fix Trans). Se la funzione viene attivata tramite il tasto, l'immagine di proiezione è solo una visualizzazione temporanea su monitor. Questa può essere annullata con il tasto Original (Originale).

& vedi Proiezione massima di una pila di immagini con un asse di proiezione invariabile (pagina 209)
& vedi Proiezione media di una pila di immagini con un asse di proiezione invariabile (pagina 210)
& vedi Proiezione trasparente di una pila di immagini con un asse di proiezione invariabile (pagina 211)

Filtri lineari e filtri morfologici

(opzionale, vedi capitolo Pacchetti software opzionali, 3D, pagina 285 e segg., e Materials, pagina 260 e segg.)

Livellamento e filtraggio di riprese di superficie

(opzionale, vedi capitolo Pacchetti software opzionali, Materials, pagina 260 e segg.)

Identificare e separare segnali fluorescenti in sovrapposizione

In questa pagina vengono trattati i seguenti argomenti

Struttura e controllo della fase operativa Process

Process

Facendo clic sul simbolo di freccia Process (Processo), la normale struttura dell'interfaccia di comando viene completamente modificata. Tutti i tasti di funzione degli altri campi pulsanti/fasi operative si disattivano. Sul lato sinistro viene mostrata la finestra di visualizzazione Experiment Overview (Panoramica esperimento) **(1)** con gli esperimenti aperti. Più in basso si trova la finestra di navigazione **(2)** con l'albero di directory di tutte le funzioni disponibili in questa fase operativa. Al centro dell'interfaccia di comando compaiono 10 grandi zone pagina **(3)** che comprendono 10 moduli. Al di sopra di queste zone pagina si trova un campo di aiuto **(4)**, dove, tenendo il puntatore su una determinata zona pagina, è possibile visualizzare una breve spiegazione del relativo modulo.

▶	Fare clic sulla zona pagina contenente il modulo desiderato. Ad ogni livello di navigazione, puntando il mouse su una specifica zona pagina, si visualizza una spiegazione dei moduli in alto, nel campo di aiuto.
▶	Nei livelli di navigazione successivi, scegliere ogni volta una zona pagina fino a raggiungere la funzione desiderata con la relativa finestra di dialogo all'ultimo livello.
▶	Nella finestra di navigazione si può scegliere direttamente una funzione facendo clic sulla cartella corrispondente.

Nella riga di menu in alto a destra vengono suggeriti i seguenti tasti **(5)**:

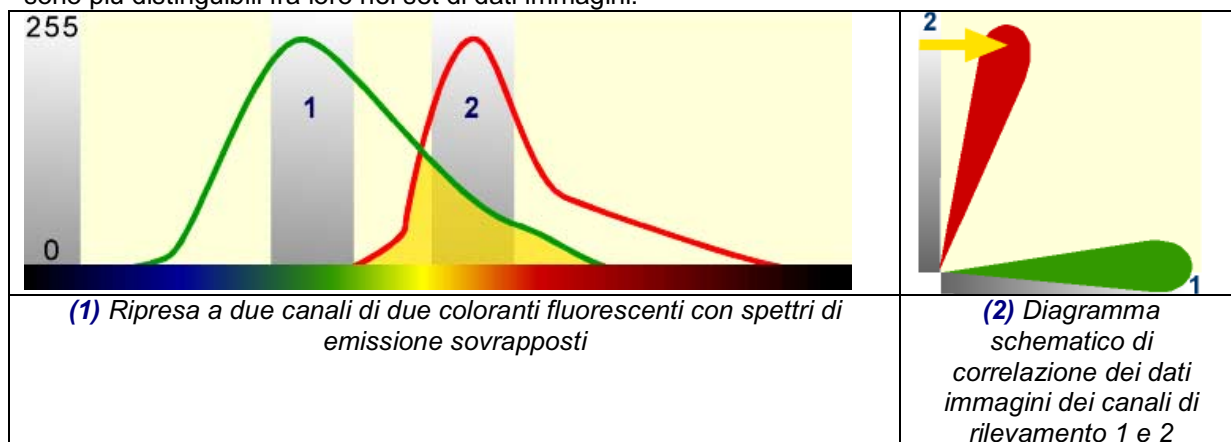
▶	Fare clic sul tasto Back (Indietro) per ritornare all'ultimo livello di navigazione visualizzato.
▶	Fare clic sul tasto Forward (Avanti) per visualizzare il livello che si era selezionato prima di aver azionato con un clic il tasto Back.
▶	Fare clic sul tasto Up (Su) per portarsi al livello gerarchicamente superiore.
▶	Fare clic sul tasto Reset (Ripristina) per riportare le variabili modificate all'ultima impostazione.
▶	Per uscire dalla fase operativa Process (Processo), fare clic sul simbolo di freccia di un'altra fase operativa (per esempio, Acquire).

Nell'estremità inferiore di ogni finestra di dialogo si trovano questi due pulsanti:

▶	Fare clic sul pulsante Preview (Anteprima) per eseguire la funzione selezionata e visualizzare l'immagine finale a destra, nella finestra di anteprima.
▶	Fare clic sul tasto Apply (Applica) per applicare la funzione selezionata al record di dati immagine attivo, visualizzare l'immagine finale nella finestra di visualizzazione Viewer e creare un nuovo file nell'esperimento attivo.

Utilità degli strumenti di ricostruzione a più colori (Dye Finder)
Molti dei coloranti fluorescenti utilizzati nella microscopia a fluorescenza emettono luce fluorescente in campi di lunghezze d'onda molto vicini fra loro, in modo tale che gli spettri di emissione dei segnali fluorescenti si sovrappongono. Se i preparati vengono marcati con detti coloranti fluorescenti, e se i coloranti vengono rilevati simultaneamente, possono verificarsi sovrapposizioni di segnali fluorescenti.

Questo fenomeno, denominato diafonia ottica, comporta il fatto che più segnali fluorescenti vengono rilevati in un solo canale di rilevamento. Dopo l'acquisizione immagini, detti segnali fluorescenti non sono più distinguibili fra loro nel set di dati immagini.

(1) Ripresa a due canali di due coloranti fluorescenti con spettri di emissione sovrapposti	*(2) Diagramma schematico di correlazione dei dati immagini dei canali di rilevamento 1 e 2*

La figura (1) illustra la problematica della diafonia. Per un'acquisizione immagini in due canali di rilevamento vengono utilizzati due coloranti fluorescenti, i cui spettri di emissione si sovrappongono. Mentre nel canale di rilevamento 1 viene rilevata esclusivamente la luce di emissione del colorante fluorescente verde, nel canale di rilevamento 2 si sovrappongono i segnali fluorescenti del colorante rosso e di quello verde. In conseguenza di ciò, i dati immagini rilevati nel canale di rilevamento 2 non possono più essere univocamente ricondotti al segnale fluorescente verde o a quello rosso.
La diafonia dei segnali fluorescenti viene resa visibile anche in un diagramma di correlazione. I diagrammi di correlazione illustrano la ripartizione complessiva di due variabili; nella figura (2) le variabili sono i segnali fluorescenti nel canale di rilevamento 1 e nel canale di rilevamento 2. La nube di punti del colorante fluorescente rosso tende verso le diagonali della superficie del diagramma di correlazione, dal momento che nel canale di rilevamento 2 è stata rilevata anche una determinata quota del colorante fluorescente verde. Un diagramma di correlazione simile è disponibile, per una prima interpretazione di un set di dati immagini, nel Leica Confocal Software, con il cosiddetto citofluorogramma. Tramite il citofluorogramma è possibile visualizzare la ripartizione complessiva di set di dati immagini con un numero di canali di rilevamento (coloranti fluorescenti) fino a tre.

& vedi Multicolor / Creare un citofluorogramma bidimensionale (pagina 274)

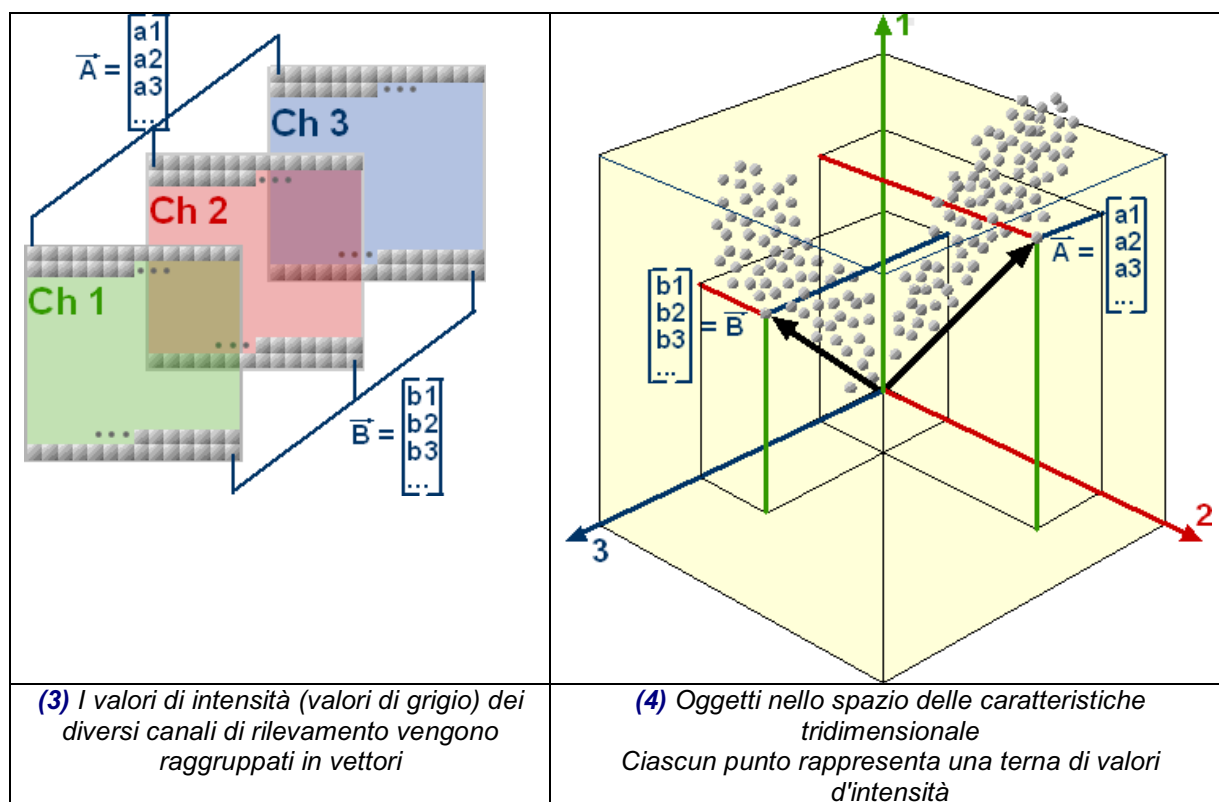
Con le funzioni della Ricostruzione a più colori (Dye Finder) è possibile separare nuovamente segnali fluorescenti sovrapposti dopo l'acquisizione immagini, con l'ausilio di diversi processi matematici:

Funzione	**Descrizione**
Adaptive Dye Separation	L'algoritmo della separazione coloranti adattativa utilizza un'analisi dei cluster per l'identificazione e la separazione dei segnali fluorescenti. Non è necessario alcun dato di riferimento dei coloranti fluorescenti utilizzati per la creazione del set di dati immagini. Questa funzione è applicabili alle serie di immagini spaziali, temporali e alle serie lambda.
Spectral Dye Separation	L'algoritmo della separazione coloranti spettrale esegue una scomposizione in valori singolari basata sui pixel. Sono necessari dati di riferimento degli spettri di emissione dei coloranti fluorescenti utilizzati per la creazione del set di dati immagini. Questa funzione è applicabile esclusivamente alle serie lambda.
Dimensionality Reduction	L'algoritmo della riduzione dimensionalità si basa su un'analisi delle componenti principali. Con questa funzione è possibile ridurre serie lambda pluridimensionali a poche dimensioni, ossia fotogrammi. Questa funzione è applicabile esclusivamente alle serie lambda.
Manual Dye Separation	Questa funzione consente l'inserimento manuale di fattori (coefficienti a matrice), per ridurre o aumentare le informazioni dei segnali in singoli canali di rilevamento.

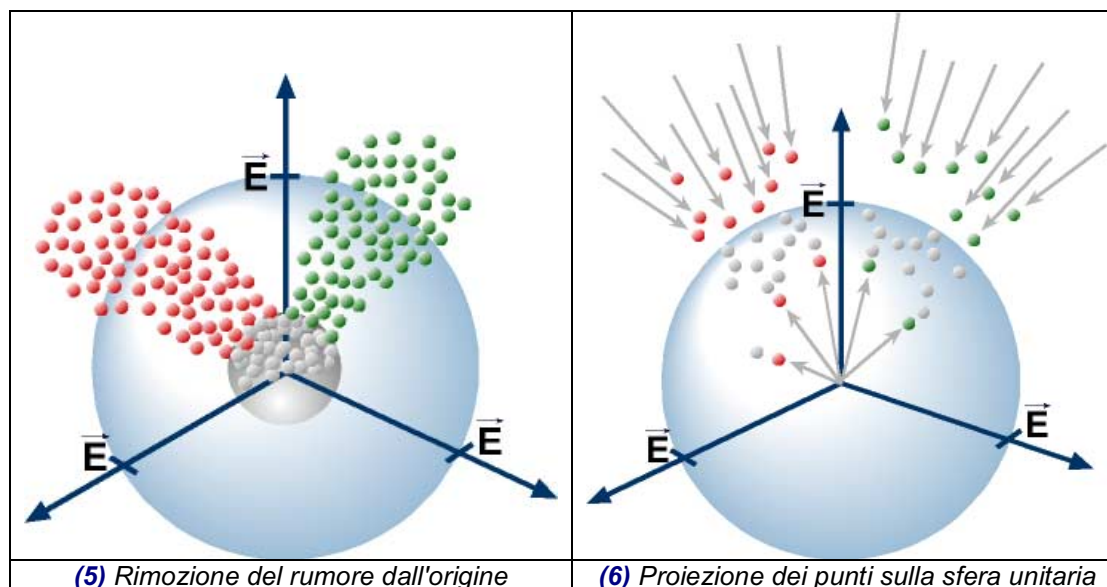
Il principio della separazione coloranti adattativa (Adaptive Dye Separation)

Tramite l'algoritmo della separazione coloranti adattativa è possibile identificare e separare in un set di dati immagini i segnali fluorescenti, senza conoscere i coloranti fluorescenti utilizzati. Ciò è possibile con la cosiddetta analisi dei cluster. L'analisi dei cluster è un processo matematico volto alla suddivisione di oggetti in gruppi omogenei (cluster). La suddivisione in gruppi avviene tramite una variabile, ossia una caratteristica, che descrive tutti gli oggetti esaminati. Un gruppo è omogeneo se i suoi oggetti sono il più possibile simili fra loro in riferimento alla variabile (caratteristica).

Questo metodo di classificazione matematica viene applicato al problema dei segnali fluorescenti sovrapposti. Nel caso degli oggetti da classificare, si tratta dei valori di intensità (valori di grigio dei pixel) che sono stati rilevati in diversi canali di rilevamento (campi di lunghezze d'onda). Se tutte le combinazioni di questi valori d'intensità vengono rappresentati nel cosiddetto spazio delle caratteristiche, vi è la possibilità di classificare queste ultime in gruppi, vale a dire di associarle ad un colorante fluorescente. Quale variabile di caratteristica viene utilizzata l'altezza del valore d'intensità nei rispettivi canali di rilevamento.

(3) *I valori di intensità (valori di grigio) dei diversi canali di rilevamento vengono raggruppati in vettori*	**(4)** *Oggetti nello spazio delle caratteristiche tridimensionale Ciascun punto rappresenta una terna di valori d'intensità*

Per l'applicazione dell'analisi dei cluster, le combinazioni dei valori d'intensità vengono rappresentate come punti nel campo delle caratteristiche **(4)**. A differenza dello spazio delle locazioni, con i suoi tre assi spaziali, lo spazio delle caratteristiche è uno spazio geometrico, le cui dimensioni vengono rappresentate da variabili. Nel caso dei set di dati immagini esaminati nella microscopia a fluorescenza, gli assi dello spazio delle caratteristiche sono i valori d'intensità che sono stati misurati in diversi canali di rilevamento (campi di lunghezze d'onda) **(3)**. Ciascun punto nello spazio delle caratteristiche è caratterizzato da un vettore.

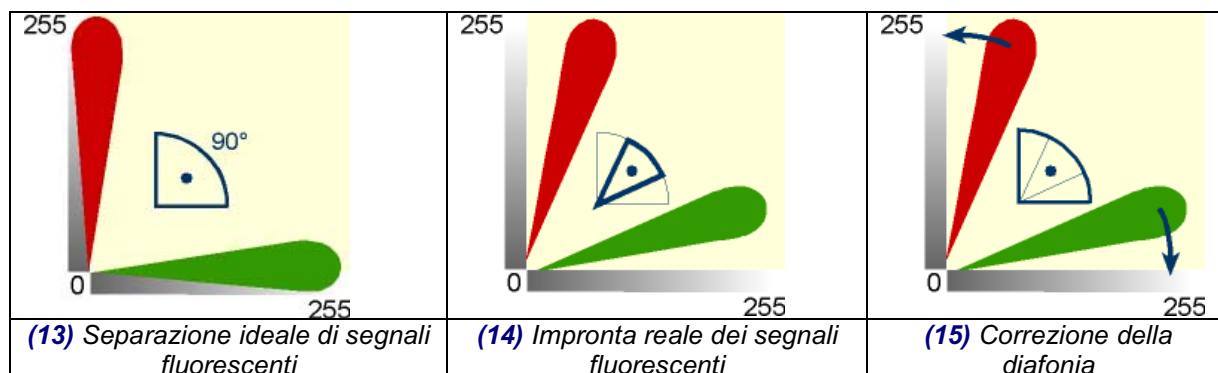
I singoli passi dell'analisi dei cluster
I primi due passi dell'analisi dei cluster servono a ridurre la quantità di dati, e quindi a velocizzare i calcoli. In un primo passo vengono rimossi i punti che si trovano nelle immediate vicinanze dell'origine dello spazio delle caratteristiche **(5)**. Detti dati, nel campo dei valori inferiore, sono costituiti da rumore che non contiene informazioni sul preparato, e che può perciò essere eliminato. Il secondo passo consiste nel proiettare i punti dispersi nello spazio delle caratteristiche sulla sfera unitaria, ossia una sfera di raggio 1 **(6)**.

(5) *Rimozione del rumore dall'origine*	***(6)*** *Proiezione dei punti sulla sfera unitaria*

Viene quindi eseguita l'analisi dei cluster vera a propria. Scopo dell'analisi dei cluster è di distinguere tanti gruppi di punti nello spazio delle caratteristiche quanti coloranti fluorescenti sono stati utilizzati per la creazione del set di dati immagini. La misura in base alla quale viene determinata la verosimiglianza o la non verosimiglianza dei punti è la distanza euclidea (la somma delle distanze quadratiche) dei punti da punti mediani calcolati. Con detta misura vengono ricercati gruppi di punti nei quali ciascun punto ha una distanza inferiore dal punto mediano del proprio gruppo rispetto ai punti centrali degli altri gruppi:

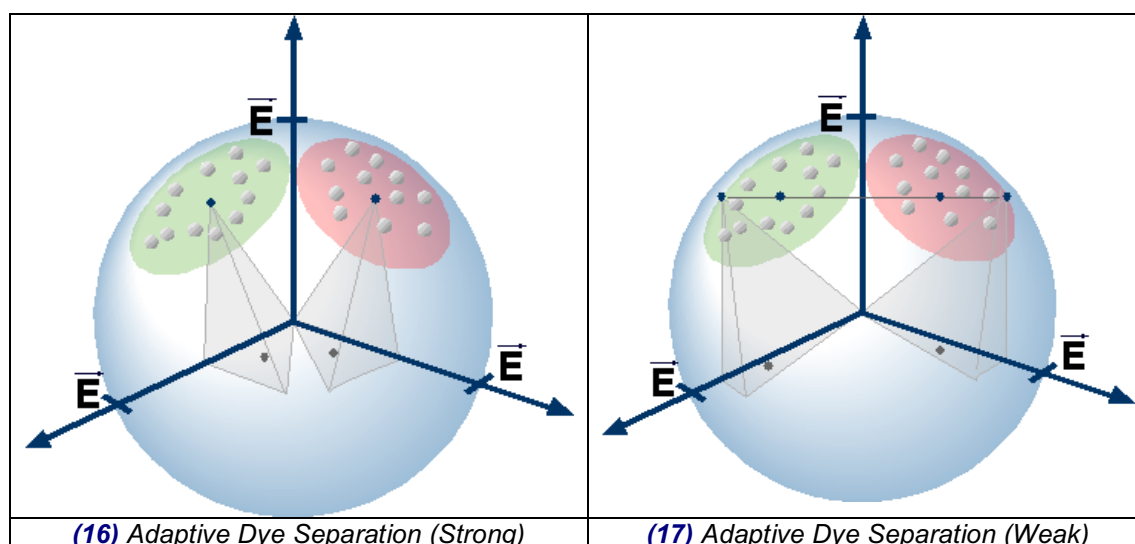
(7) *Vengono definiti due cluster a piacimento con punti mediani.*	***(8)*** *Ogni punto viene associato al punto mediano al quale è più vicino.*	***(9)*** *La posizione dei punti mediani viene nuovamente calcolata.*
(10) *Nuovi cluster dopo la correzione dei punti mediani.*	***(11)*** *Ogni punto viene associato al punto mediano al quale è più vicino.*	***(12)*** *La posizione dei punti mediani viene nuovamente calcolata.*

Dapprima viene predefinito un determinato numero di cluster con punti mediani **(7)**. Detto numero va inserito nell'interfaccia operatore prima del calcolo. Ogni punto dello spazio delle caratteristiche viene quindi associato al punto mediano al quale è più vicino **(8)**. Per ciascun cluster viene calcolato il nuovo punto mediano **(9)**. Tutti i punti vengono nuovamente associati al punto mediano al quale essi sono più vicini **(11)**, e i punti mediani del nuovo calcolo vengono nuovamente calcolati **(12)**. Questo procedimento viene ripetuto sino a quando i gruppi cessano di variare.

Correzione della diafonia
Dopo che i coloranti fluorescenti sono stati isolati, tramite l'analisi dei cluster, come gruppi separati di punti nello spazio delle caratteristiche, occorre correggere la sovrapposizione dei segnali fluorescenti. La sovrapposizione appare nello spazio delle caratteristiche sull'angolo delle nubi di punti, sugli assi dello spazio delle caratteristiche.

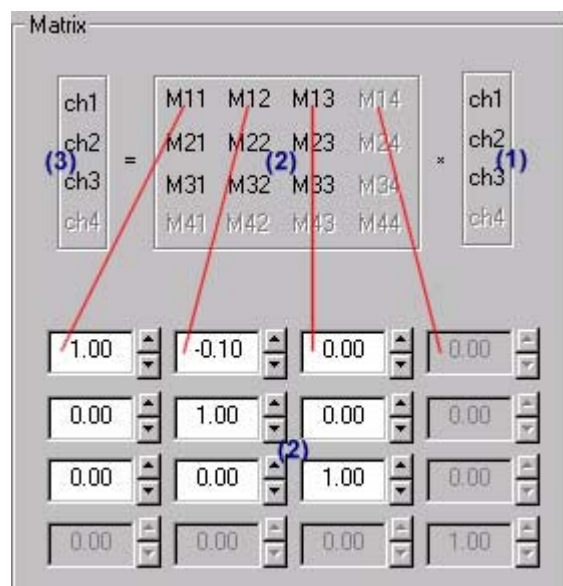
(13) *Separazione ideale di segnali fluorescenti*	***(14)*** *Impronta reale dei segnali fluorescenti*	***(15)*** *Correzione della diafonia*

Poiché, dal punto di vista matematico, le nubi di punti di due variabili completamente indipendenti, vale a dire non correlate, sono sfalsate fra loro di 90° nello spazio delle caratteristiche nell'angolo a destra **(13)**. I set di dati immagini con segnali fluorescenti sovrapposti presentano ciononostante nubi di punti orientate verso le diagonali dello spazio a causa dei dati immagini in correlazione. Quanto più è acuto l'angolo tra le nubi di punti, tanto più forte sarà la correlazione dei segnali fluorescenti **(14)**. Per separare i segnali fluorescenti occorre perciò che le nubi di punti siano ricalcolate matematicamente in un angolo a destra.

A questo scopo è necessario stabilire per ciascun cluster un punto di riferimento, dalla cui lunghezza nello spazio risulti l'angolo di riferimento.

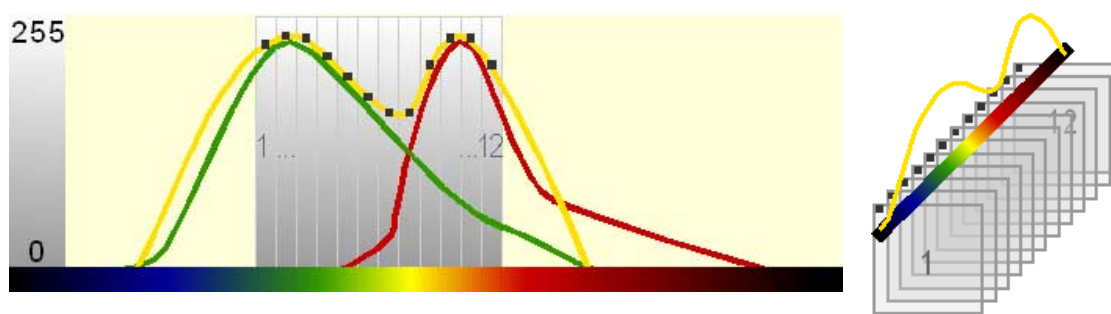
(16) *Adaptive Dye Separation (Strong)*	***(17)*** *Adaptive Dye Separation (Weak)*

L'angolo calcolato, con le relative linee rette, viene ricondotto con un calcolo, oppure sottratto, a ciascun punto della nube di punti originaria. Tale procedimento viene eseguito con un'operazione a matrici. Ciò corrisponde ad una proiezione sui piani dello spazio delle caratteristiche. Il risultato è che le rette/le nubi di punti inclinate vengono nuovamente "raddrizzate", o, altrimenti detto, separate le une dalle altre. Tale procedimento è visualizzabile tramite il citofluorogramma.

Navigazione: Dye Finder\ Adaptive Dye Separation (Strong)
Navigazione: Dye Finder\ Adaptive Dye Separation (Weak)

▶	Selezionare nella finestra di visualizzazione Experiment Overview (Panoramica esperimento) il set di dati immagini che si desidera elaborare con la separazione coloranti adattativa, facendo un doppio clic sul file. Il set di dati immagini può essere una serie immagini spaziale, temporale o una serie lambda.
▶	Correggere nel campo Fluorescent Dyes (Coloranti fluorescenti), se necessario, il numero dei coloranti fluorescenti che sono stati utilizzati per la creazione del set di dati immagini. Il software inserisce automaticamente in questo campo, come valore, il numero dei canali di rilevamento.
▶	

Navigazione: Dye Finder\ Manual Dye Separation
Grazie a questa funzione, tramite una moltiplicazione di matrice, è possibile ridurre il rilevamento di segnali indesiderati di un record di dati immagine con un massimo di quattro canali di rilevamento.

Nella finestra di dialogo è rappresentata la moltiplicazione di matrice. I valori pixel dei 4 canali massimi possibili dell'immagine originale da elaborare **(1)** vengono compensati a vicenda con l'ausilio dei fattori M11- M44 **(2)**. Gli indici dei fattori M si riferiscono ai canali. Il fattore M12, per esempio, rappresenta la componente di informazioni sul segnale che il canale 2 dell'immagine originale **(1)** deve avere nel canale 1 dell'immagine finale **(3)**. Poiché i fattori M11, M22, M33 e M44 si riferiscono allo stesso canale dell'immagine originale e dell'immagine finale, questi fattori sono impostati al valore 1.

▶	Nella finestra di visualizzazione Experiment Overview (panoramica esperimento), selezionare il record di dati immagine da elaborare facendo doppio clic sul file.
▶	Modificando il fattore M, si riducono o si aumentano le informazioni sul segnale nel canale dell'immagine finale. Per esempio, per togliere la diafonia del canale 2 nel canale 1 dal canale 1 dell'immagine finale, occorre immettere un numero negativo compreso tra 0 e 1 nel campo M12. Immettendo numeri positivi compresi tra 0 e 1 nel campo M12, si aumentano le informazioni sul segnale nel canale 1 dell'immagine finale.

Il principio della separazione coloranti spettrale (Spectral Dye Separation)
Con l'algoritmo della separazione coloranti spettrale è possibile identificare e separare in un set di dati immagini segnali fluorescenti, con l'ausilio di dati di riferimento degli spettri di emissione dei coloranti fluorescenti utilizzati. Ciò è possibile con la cosiddetta scomposizione in valori singolari.

(18) Ripresa di una serie lambda con 12 fotogrammi

Questo procedimento sui basa sull'assunto che ciascun pixel di un set di dati immagini sia composto da una sovrapposizione lineare degli spettri di emissione dei coloranti fluorescenti utilizzati per l'acquisizione immagini. La figura **(18)** mostra il segnale fluorescente giallo di una serie lambda originata dagli spettri di emissione sovrapposti dei coloranti fluorescenti verde e rosso. Con i dati di riferimento degli spettri di emissione dei due coloranti fluorescenti è possibile calcolare i coefficienti che descrivono la quota di ciascun colorante fluorescente in quella data singola banda di rilevamento. Con l'ausilio di detti coefficienti è inoltre possibile calcolare, a partire dal segnale fluorescente giallo, due distinti set di dati immagini, nei quali anche in tal caso è presente soltanto quota di un colorante fluorescente.

Navigazione: Dye Finder\ Spectral Dye Separation

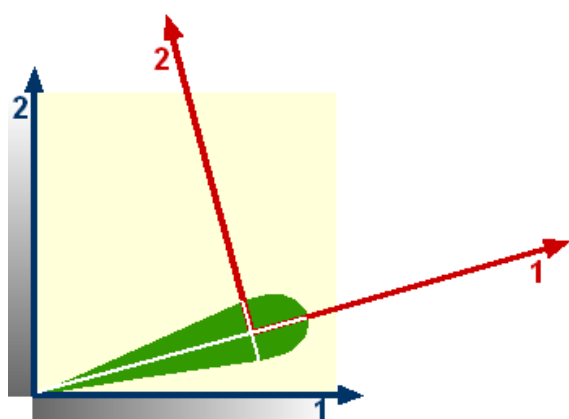
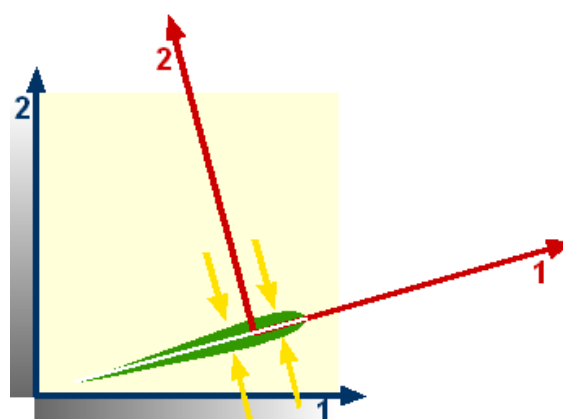
▶	Nella finestra di visualizzazione Experiment Overview (panoramica esperimento), selezionare il record di dati immagine da elaborare facendo doppio clic sul file. Con questa funzione è possibile elaborare le sole serie lambda.
▶	Scegliere nel campo Dye Selection (Selezione colorante) i coloranti fluorescenti che sono stati utilizzati per la ripresa del set di dati immagini da elaborare selezionando una casella di spunta e scegliendo un colorante fluorescente dal campo d'elenco.

Se i dati di riferimento dei coloranti fluorescenti desiderati non dovessero essere disponibili, o se l'utente desidera utilizzare alcuni dati di riferimento, è possibile importarli servendosi dell'Editor di coloranti.

Il principio della riduzione di dimensionalità

Le serie lambda sono immagini di un singolo piano ottico che vengono rilevate su un determinato campo di lunghezze d'onda, ciascuna ad una determinata lunghezza d'onda. In questa fase le informazioni sul preparato vengono rilevate nei fotogrammi in maniera ridondante. Tramite l'algoritmo della riduzione di dimensionalità è possibile eliminare l'informazione immagine ridondante nelle serie lambda. Inoltre, i dati immagini della serie lambda rilevati in un solo canale di rilevamento vengono separati in funzione dei coloranti fluorescenti, e rappresentati in canali di rilevamento separati.

Il procedimento utilizzato in questa fase si basa sulla cosiddetta analisi delle componenti principali. Il principio dell'analisi delle componenti principali consiste nel convertire dati immagine correlati in dati immagini non correlati. A tale scopo viene eseguita una trasformazione del sistema di coordinate. Scopo della trasformazione è l'individuazione delle cosiddette componenti principali (assi principali) delle nubi di punti nello spazio delle caratteristiche pluridimensionale, tramite lo spostamento del punto zero e la rotazione del sistema di coordinate. Nell'osservazione delle serie lambda nello spazio delle caratteristiche, ciascun campo di lunghezze d'onda in cui un'immagine è stata ripresa rappresenta una dimensione.

& vedi Il principio della separazione coloranti adattativa (pagina 234)

***(19)** Trasformazione del sistema di coordinate* ***(20)** Riduzione di dimensionalità*

Dapprima viene impostata l'origine del sistema di coordinate nel baricentro di ciascuna nube di punti. Il secondo passo consiste nel ruotare il sistema di coordinate in modo tale che la prima coordinata sia orientata verso la varianza maggiore della nube di punti. La seconda coordinata (e ogni altra nello spazio delle caratteristiche pluridimensionale), che deve trovarsi in posizione ortogonale rispetto alla prima coordinata, viene scelta in modo tale che essa descriva la maggiore quota possibile della varianza residua **(19)**. Nel nuovo sistema di coordinate la maggior parte della varianza si trova in direzione dell'asse x, ed una quota minore in direzione dell'asse y.

Per ottenere la riduzione di dimensionalità, le componenti principali con varianza relativamente piccola vengono trascurate **(20)**. In questa fase non viene perduta alcuna informazione rilevante, in quanto dette componenti contengono solamente rumore o quote di informazioni ridondanti. Infine, i dati immagine delle nubi di punti compresse vengono rappresentati in canali di rilevamento separati.

Navigazione: Dye Finder\ Dimensionality Reduction

▶	Nella finestra di visualizzazione Experiment Overview (Panoramica esperimento), selezionare il set di dati immagine da elaborare facendo doppio clic sul file. Con questa funzione è possibile elaborare le sole serie lambda.
▶	Inserire nel campo Number of Dimensions (Numero di dimensioni) il numero dei coloranti fluorescenti che sono stati utilizzati per la creazione del set di dati immagini.

Segmentazione di strutture immagini

(opzionale, vedi capitolo Pacchetti software opzionali, 3D, pagina 285 e segg.)

Funzioni di misurazione e di analisi

Calcolare un istogramma

Funzione

Con la funzione Histogram (Istogramma) si misura la frequenza di una grandezza, la si rappresenta in una curva e si calcolano altri valori statistici diversi. L'istogramma viene calcolato dal record di dati selezionato nella finestra di visualizzazione Viewer. Questo record di dati può rappresentare una serie spaziale, una serie temporale o una serie lambda. I valori statistici vengono rilevati in base alla grandezza della terza dimensione - altezza (z) per serie spaziali, tempo (t) per serie temporali, lunghezza d'onda (λ) per serie lambda.

▶	Fare clic sul tasto Histogram.
▶	Si apre una finestra di visualizzazione in cui compaiono la curva di misurazione per ogni canale di rilevamento e i valori statistici.

Parametro	Significato	Formula
# Pixel	Numero totale di pixel che convergono nel calcolo dell'istogramma. Corrisponde al formato di scansione impostato.	
Mean	La media aritmetica	$\mu(I) = \frac{1}{N_{Pixel}} \sum_i I_i$
Maximum	Valore massimo	Max (I)
Minimum	Valore minimo	Min (I)
Variance	Varianza	$VAR(I) = \frac{1}{N-1} \sum_i (I_i - \mu(I))^2$
Average Deviation	Deviazione media	$DISP(I) = \frac{1}{N-1} \sum_i \lvert I_i - \mu(I) \rvert$
Standard Deviation	Deviazione standard	$s(I) = \sqrt{VAR(I)} = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_i (I_i - \mu(I))^2}$
Mean Energy	Energia grafica media	$I^2 mean = \frac{1}{N_{Pixel}} \sum_i I_i^2$
Root Mean Square (RMS)	Media quadratica	$RMS = \sqrt{\frac{1}{N_{Pixel}} \sum_i I_i^2}$
Skewness	Coefficiente di asimmetria della distribuzione	$Skew(I) = \frac{1}{N} \sum_i \left[\frac{I_i - \mu(I)}{\sqrt{VAR(I)}} \right]^3$

Alcuni parametri sono indicati nella notazione esponenziale scientifica; per esempio, Pixel = 3.28e+005 = 327680 (corrisponde al formato di scansione 640 x 512).

Il valore massimo e il valore minimo dell'intensità regolano l'impostazione ottimale del valore Gain (guadagno) e Offset dei rivelatori.

Misurazione di un profilo all'interno di un campo di analisi (ROI)

Funzione
Con la funzione Profile (z) (Profilo) viene misurata una grandezza all'interno di un campo di analisi, questa viene rappresentata in una curva e si calcolano diversi valori statistici. Il profilo viene misurato dal record di dati selezionato nella finestra di visualizzazione Viewer. Questo record di dati può rappresentare una serie spaziale, una serie temporale o una serie di lunghezze d'onda.I valori statistici vengono rilevati in base alla grandezza della terza dimensione - altezza (z) per serie spaziali, tempo (t) per serie temporali, lunghezza d'onda (λ) per serie lambda.

▶	Fare clic sul tasto Profile (z) e tracciare un campo di analisi (ROI) nell'immagine. I tasti con cui si definisce un campo di analisi si attivano insieme al tasto Profile (z). & vedi Definire un campo di analisi (ROI) come ellisse (pagine 246) & vedi Definire un campo di analisi (ROI) come poligono & vedi Definire un campo di analisi (ROI) come rettangolo

	& vedi Definizione automatica del campo di analisi (ROI) & vedi Marcare e spostare un campo di analisi (ROI) & vedi Cancellare campi di analisi (ROI)
▶	Si apre automaticamente una finestra di visualizzazione in cui compaiono la curva di misurazione per ogni canale di rilevamento e i valori statistici.

Parametro	**Significato**	**Formula**
# Pixel(ROI)	Numero di pixel all'interno del campo di analisi selezionato	
Area	Area del campo di analisi	$A = \int_0^A d_A A$
Length	Altezza della pila di immagini (serie spaziale) Durata di registrazione (serie temporale) Ampiezza di banda (serie lambda)	$L = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2}$
Mean Amplitude	Media aritmetica	$\mu(I) = \frac{1}{N_{Pixel}} \sum_{Pixel} I_i$
Maximum Amplitude	Valore massimo	Max (I)
Position Maximum Amplitude	Posizione del valore massimo	Arg Max I (z), (t), (λ)
Minimum Amplitude	Valore minimo	Min (I)
Position Minimum Amplitude	Posizione del valore minimo	Arg Min I (z), (t), (λ)
Average Deviation	Deviazione media	$DISP(I) = \frac{1}{N-1} \sum_i \lvert I_i - \mu(I) \rvert$
Standard Deviation	Deviazione standard	$s(I) = \sqrt{VAR(I)} = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_i (I_i - \mu(I))^2}$
Variance	Varianza	$VAR(I) = \frac{1}{N-1} \sum_i (I_i - \mu(I))^2$

I seguenti 4 valori di misura compaiono solo se nella finestra di dialogo Viewer Options è selezionata la funzione Misurazione di due punti

▶	Selezionare il menu View, opzione Experiment Overview, icona Charts. & vedi Finestra di dialogo Viewer Options, icona Charts (pagina 188)
▶	Nel campo Measurement (misurazione), la misurazione di due punti può essere attivata o disattivata selezionando 2 Point (due punti) o Off.

I(µm); I(s); I(nm)	Intensità misurata al punto 1 (z, t,)	$I(z_1)$; $I(t_1)$; $I(\lambda_1)$
I(z); I(t); I(λ)	Intensità misurata al punto 2 (z, t,)	$I(z_2)$; $I(t_2)$; $I(\lambda_2)$
dI, dz	Differenza dei valori tra il punto 1 e 2	$\lvert I(z_1) - I(z_2) \rvert$; $\lvert I(t_1) - I(t_2) \rvert$, $\lvert I(\lambda_1) - I(\lambda_2) \rvert$
d(z), (t), (λ)	Altezza (z), durata di registrazione (t), ampiezza di banda (λ) tra i punti 1 e 2	$\lvert z_1 - z_2 \rvert$; $\lvert t_1 - t_2 \rvert$, $\lvert \lambda_1 - \lambda_2 \rvert$

Applicazioni tipiche
Questa funzione può essere utilizzata per calcolare i picchi di intensità all'interno di una pila di immagini. Questi, a loro volta, consentono l'impostazione ottimale dei rivelatori. Inoltre, con questa funzione, è possibile calcolare il picco di emissione di una serie lambda. Regolando la larghezza e la posizione dei diaframmi davanti ai rivelatori, dal campione si può registrare una quantità di luce di

emissione maggiore che con i filtri ottici convenzionali. Con serie temporali, questa funzione può far rilevare il momento di massima attività di fluorescenza.

Questa funzione di quantificazione è solo offline, è cioè disponibile solo per i record di dati già registrati.

Misurazione di un profilo lungo un segmento

Funzione
Con la funzione Profile (Profilo) si misura una grandezza lungo un segmento, la si rappresenta in una curva e si calcolano diversi valori statistici. Il profilo viene misurato dal record di dati selezionato nella finestra di visualizzazione Viewer. Questo record di dati può rappresentare una serie spaziale, una serie temporale o una serie lambda. I valori statistici vengono rilevati in base alla grandezza della terza dimensione - altezza (z) per serie spaziali, tempo (t) per serie temporali, lunghezza d'onda (λ) per serie lambda.

▶	Fare clic sul tasto Profile. Nella finestra di visualizzazione Viewer, il segmento di misura viene rappresentato nell'immagine come una linea bianca. La lunghezza e la posizione del segmento di misura possono essere modificate a piacere facendo clic sul segmento e, con il tasto sinistro del mouse premuto, portando i punti di presa alla posizione desiderata.
▶	Si apre automaticamente una finestra di visualizzazione in cui compaiono la curva di misurazione per ogni canale di rilevamento e i valori statistici.

Parametro	Significato	Formula
Length	Lunghezza del segmento di misura	$L = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2}$
Mean Amplitude	Media aritmetica della grandezza di misurazione	$\mu(I) = \frac{1}{N_{Pixel}} \sum_{Pixel} I_i$
Maximum Amplitude	Valore massimo della grandezza di misurazione	Max (I)
Minimum Amplitude	Valore minimo della grandezza di misurazione	Min (I)
Average Deviation	Deviazione media statistica dei valori rispetto al valore medio della grandezza di misurazione	$DISP(I) = \frac{1}{N-1} \sum_i \lvert I_i - \mu(I) \rvert$
Standard Deviation	Deviazione standard dei valori della grandezza di misurazione	$s(I) = \sqrt{VAR(I)} = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_i (I_i - \mu(I))^2}$
Variance	Varianza della grandezza di misurazione	$VAR(I) = \frac{1}{N-1} \sum_i (I_i - \mu(I))^2$

I seguenti 4 valori di misura compaiono solo se nella finestra di dialogo Viewer Options è selezionata la funzione Misurazione di due punti

▶	Selezionare il menu View, opzione Experiment Overview, icona Charts. & vedi Finestra di dialogo Viewer Options, icona Charts (pagina 188)
▶	Nel campo Measurement (misurazione), la misurazione di due punti può essere attivata o disattivata selezionando 2 Point (due punti) o Off.

Parametro	Significato	Formula
I(µm); I(s); I(nm)	Valore misurato al punto 1 (z, t, λ)	$I(z_1)$; $I(t_1)$; $I(\lambda_1)$
I(µm); I(s); I(nm)	Valore misurato al punto 2 (z, t, λ)	$I(z_2)$; $I(t_2)$; $I(\lambda_2)$
dI, dz	Differenza dei valori tra il punto 1 e 2	$\|I(z_1) - I(z_2)\|$; $\|I(t_1) - I(t_2)\|$, $\|I(\lambda_1) - I(\lambda_2)\|$
d(z), (t), (λ)	Altezza (z), durata di registrazione (t), ampiezza di banda (λ) tra i punti 1 e 2	$\|z_1 - z_2\|$; $\|t_1 - t_2\|$, $\|\lambda_1 - \lambda_2\|$

Questa funzione di quantificazione è solo offline, è cioè disponibile solo per i record di dati già registrati.

Misurazione di superfici e volumi

(opzionale, vedi capitolo Pacchetti software opzionali, Materials, pagina 260 e segg.)

Copiare grafi di quantificazione nella pagina di presentazione

Funzione

Con la funzione Snap Quantification Data (Fotografa dati di quantificazione), i dati calcolati dalle funzioni di quantificazione vengono copiati in una pagina di presentazione. Nella pagina di presentazione possono essere copiati i valori calcolati dalle seguenti funzioni di quantificazione, che riportano anche un grafo di analisi:

& vedi Creare una pagina di presentazione (pagina 252)

Prof.	& vedi Misurazione di un profilo lungo un segmento (pagina 243)
Pr. (z)	& vedi Misurazione di un profilo all'interno di un campo di analisi (ROI) (pagina 241)
Mat.	& vedi Misurazione di superfici e volumi (pagina 272)
R-Prof.	& vedi Misurazioni di rugosità lungo un segmento (pagina 260)

Stampare grafi di quantificazione

Funzione

Con la funzione Print Quantification Data (Stampa dati di quantificazione), i dati calcolati dalle funzioni di quantificazione vengono inviati alla stampante standard. Si possono stampare i valori calcolati dalle seguenti funzioni di quantificazione, che riportano anche un grafo di analisi:

Prof.	& vedi Misurazione di un profilo lungo un segmento (pagina 243)
Pr. (z)	& vedi Misurazione di un profilo all'interno di un campo di analisi (ROI) (pagina 241)
Mat.	& vedi Misurazione di superfici e volumi (pagina 272)
R-Prof.	& vedi Misurazioni di rugosità lungo un segmento (pagina 260)

Questa funzione è disponibile anche nel menu contestuale all'interno della finestra di visualizzazione delle funzioni di quantificazione:

▶	Tenere il puntatore sopra la finestra di visualizzazione aperta da una funzione di quantificazione.
▶	Fare clic con il tasto destro del mouse e selezionare il punto di menu Print (Stampa).

Esportare dati di quantificazione

Funzione

Con la funzione Export Quantification Data (Esporta dati di quantificazione), i dati calcolati dalle funzioni di quantificazione possono essere esportati come dati ASCII. I dati possono così essere letti ed elaborati, per esempio, in Excel. Si possono esportare i valori calcolati dalle seguenti funzioni di quantificazione, che riportano anche un grafo di analisi:

Prof.	& vedi Misurazione di un profilo lungo un segmento (pagina 243)
Pr. (z)	& vedi Misurazione di un profilo all'interno di un campo di analisi (ROI) (pagina 241)
Mat.	& vedi Misurazione di superfici e volumi (pagina 272)
R-Prof.	& vedi Misurazioni di rugosità lungo un segmento (pagina 260)

Questa funzione è disponibile anche nel menu contestuale all'interno della finestra di visualizzazione delle funzioni di quantificazione:

▶	Tenere il puntatore sopra la finestra di visualizzazione aperta da una funzione di quantificazione.
▶	Fare clic con il tasto destro del mouse e selezionare il punto di menu Export (Esporta).

Definire un campo di analisi (ROI) come ellisse

Funzione

Con il tasto Ellipse (Ellisse) si può definire un campo di analisi ellittico (Region of Interest o ROI) nell'immagine:

▶	Fare clic sul tasto Ellipse.
▶	Premere il tasto sinistro del mouse sul punto dell'immagine dove deve trovarsi un angolo del campo di analisi.
▶	Con il tasto sinistro del mouse premuto, tirare il cursore diametralmente all'angolo opposto per definire il secondo punto d'angolo del campo di analisi.

& vedi Marcare e spostare un campo di analisi (ROI) (pagina 249)
& vedi Spostare e ruotare un campo di analisi (ROI) (pagina 250)

& vedi Cancellare campi di analisi (pagina 250)

Condizioni secondarie
Le funzioni di quantificazione richiedono la definizione di un campo di analisi nell'immagine. Pertanto il tasto Ellipse si attiva solo dopo aver avviato una funzione di quantificazione con uno dei seguenti tasti:

Pr. (z)	& vedi Misurazione di un profilo all'interno di un campo di analisi (ROI) (pagina 241)
Hist	& vedi Calcolare un istogramma (pagina 240)
R-Area	& vedi Misurazioni di rugosità all'interno di un campo di analisi (ROI) (pagina 261)

Definire un campo di analisi (ROI) come poligono

Funzione
Con il tasto Polygon (Poligono), si può definire a piacere un campo di analisi a forma di poligono (Region of Interest o ROI) nell'immagine:

▶	Fare clic sul tasto Polygon.
▶	Premere il tasto sinistro del mouse sul punto dell'immagine dove deve trovarsi un angolo del campo di analisi.
▶	Per definire altri punti d'angolo del poligono, rilasciare il tasto del mouse, portare il cursore all'angolo successivo e fare nuovamente clic con il tasto sinistro del mouse. Ripetere questo passaggio per ogni angolo del poligono che si desidera definire.
▶	Per tracciare il poligono a mano libera, tenere premuto il tasto sinistro del mouse tracciando contemporaneamente il campo di analisi nell'immagine.
▶	Facendo doppio clic, si può chiudere il poligono.

& vedi Marcare e spostare un campo di analisi (ROI) (pagina 249)
& vedi Spostare e ruotare un campo di analisi (ROI) (pagina 250)
& vedi Cancellare campi di analisi (pagina 250)

Condizioni secondarie
Le funzioni di quantificazione richiedono la definizione di un campo di analisi nell'immagine. Pertanto, il tasto Polygon si attiva solo dopo aver avviato una funzione di quantificazione con uno dei seguenti tasti:

Pr. (z)	& vedi Misurazione di un profilo all'interno di un campo di analisi (ROI) (pagina 241)
Hist	& vedi Calcolare un istogramma (pagina 240)

	& vedi Misurazioni di rugosità all'interno di un campo di analisi (ROI) (pagina 261)

Definire un campo di analisi (ROI) come rettangolo

Funzione

Con il tasto Rectangle (Rettangolo), si può definire un campo di analisi rettangolare (Region of Interest o ROI) nell'immagine:

▶	Fare clic sul tasto Rectangle.
▶	Premere il tasto sinistro del mouse sul punto dell'immagine dove deve trovarsi un angolo del campo di analisi.
▶	Con il tasto sinistro del mouse premuto, tirare il cursore diametralmente nell'angolo opposto per definire il secondo punto d'angolo del campo di analisi.

& vedi Marcare e spostare un campo di analisi (ROI) (pagina 249)
& vedi Spostare e ruotare un campo di analisi (ROI) (pagina 250)
& vedi Cancellare campi di analisi (pagina 250)

Condizioni secondarie

Le funzioni di quantificazione richiedono la definizione di un campo di analisi nell'immagine. Pertanto, il tasto Rectangle (rettangolo) si attiva solo dopo aver avviato una funzione di quantificazione con uno dei seguenti tasti:

Pr. (z)	& vedi Misurazione di un profilo all'interno di un campo di analisi (ROI) (pagina 241)
Hist	& vedi Calcolare un istogramma (pagina 240)
R-Area	& vedi Misurazioni di rugosità all'interno di un campo di analisi (ROI) (pagina 261)

Definizione automatica del campo di analisi (ROI)

Funzione

Con il tasto Wizard si può far automaticamente definire nell'immagine una struttura a scelta come campo di analisi (Region of Interest o ROI). A seconda di quali altri tasti si sono azionati con un clic, intorno alla struttura viene creato un campo di analisi ellittico, rettangolare o a forma di poligono.

▶	Fare clic sul tasto Ellipse (Ellisse), Rectangle (Rettangolo) o Polygon (Poligono) e quindi sul tasto Wizard.
▶	Con il tasto sinistro del mouse, fare doppio clic sulla struttura dell'immagine che si desidera marcare come campo di analisi.
▶	La struttura viene automaticamente marcata come campo di analisi ellittico, rettangolare o a forma di poligono.

& vedi Definire un campo di analisi (ROI) come ellisse (pagine 246)
& vedi Definire un campo di analisi (ROI) come poligono
& vedi Definire un campo di analisi (ROI) come rettangolo
& vedi Cancellare campi di analisi (ROI)

Condizioni secondarie
Le funzioni di quantificazione richiedono la definizione di un campo di analisi nell'immagine. Perciò il tasto Wizard si attiva solo dopo aver attivato una funzione di quantificazione con uno dei seguenti tasti:

Pr. (z)	& vedi Misurazione di un profilo all'interno di un campo di analisi (ROI) (pagina 241)
Hist	& vedi Calcolare un istogramma (pagina 240)
R-Area	& vedi Misurazioni di rugosità all'interno di un campo di analisi (ROI) (pagina 261)

Marcare e spostare un campo di analisi (ROI)

Funzione
Con il tasto Select ROI (Seleziona campo di analisi), si può marcare e spostare un campo di analisi (Region of Interest o ROI) nell'immagine:

▶	Fare clic sul tasto Select ROI e quindi sul campo di analisi che si desidera spostare.
▶	Muovere il puntatore all'interno del campo di analisi.
▶	Non appena il puntatore di trasforma in una doppia freccia incrociata, premere il tasto sinistro del mouse e tenerlo premuto.
▶	Spostare il campo di analisi con il tasto sinistro del mouse premuto.

La grandezza di un campo di analisi già disegnato può essere ancora modificata:

▶	Tenere il puntatore su un bordo laterale del campo di analisi marcato finché compare una doppia freccia. Premere il tasto sinistro del mouse per tirare il campo di analisi in una direzione.
▶	Posizionando il puntatore esattamente in un punto d'angolo del campo di analisi marcato, si può modificare lo sviluppo in due direzioni contemporaneamente.

& vedi Spostare e ruotare un campo di analisi (ROI) (pagina 250)
& vedi Cancellare campi di analisi (ROI) (pagina 250)

Condizioni secondarie
Le funzioni di quantificazione richiedono la definizione di un campo di analisi nell'immagine. Pertanto il tasto Select ROI si attiva solo dopo aver avviato una funzione di quantificazione con uno dei seguenti tasti:

Pr. (z)	& vedi Misurazione di un profilo all'interno di un campo di analisi (ROI) (pagina 241)
Hist	& vedi Calcolare un istogramma (pagina 240)
R-Area	& vedi Misurazioni di rugosità all'interno di un campo di analisi (ROI) (pagina 261)

Spostare e ruotare un campo di analisi (ROI)

Funzione
Con il tasto Rotate ROI (ruota campo di analisi), si può spostare e ruotare un campo di analisi (Region of Interest o ROI) nell'immagine:

▶	Fare clic sul tasto Rotate ROI e quindi sul campo di analisi che si desidera ruotare.
▶	Posizione il puntatore esattamente nel punto d'angolo del campo di analisi marcato.
▶	Non appena il puntatore si trasforma in una doppia freccia, premere il tasto sinistro del mouse e tenerlo premuto.
▶	Ruotare il campo di analisi con il tasto sinistro del mouse premuto. Il campo di analisi viene ruotato intorno al proprio punto centrale.

La grandezza di un campo di analisi già disegnato può essere ancora modificata:

▶	Tenere il puntatore su un bordo laterale del campo di analisi marcato finché compare una doppia freccia. Premere il tasto sinistro del mouse per tirare il campo di analisi in una direzione.

& vedi Cancellare campi di analisi (pagina 250)

Condizioni secondarie
Le funzioni di quantificazione richiedono la definizione di un campo di analisi nell'immagine. Pertanto, il tasto Rotate ROI si attiva solo dopo aver avviato una funzione di quantificazione con uno dei seguenti tasti:

Pr. (z)	& vedi Misurazione di un profilo all'interno di un campo di analisi (ROI) (pagina 241)
Hist	& vedi Calcolare un istogramma (pagina 240)
R-Area	& vedi Misurazioni di rugosità all'interno di un campo di analisi (ROI) (pagina 261)

Cancellare campi di analisi (ROI)

Funzione
Con il tasto Clear (Cancella), tutti i campi di analisi definiti (ROI) possono essere cancellati in una sola volta. Per cancellare un singolo campo di analisi, fare clic sul tasto Select ROI (seleziona campo di analisi) e poi rimuovere il campo di analisi nell'immagine con l'apposito tasto della tastiera.

Condizioni secondarie
Le funzioni di quantificazione richiedono la definizione di un campo di analisi nell'immagine. Pertanto il tasto Clear si attiva solo dopo aver avviato una funzione di quantificazione con uno dei seguenti tasti:

Pr. (z)	& vedi Misurazione di un profilo all'interno di un campo di analisi (ROI) (pagina 241)
Hist	& vedi Calcolare un istogramma (pagina 240)
R-Area	& vedi Misurazioni di rugosità all'interno di un campo di analisi (ROI) (pagina 261)

Documentazione dati

Creare una pagina di presentazione

Funzione

Con il tasto Annotation (Annotazione) si apre una finestra dove le immagini riprese possono essere analizzate a scopi di presentazione. Se si è aperta la pagina di presentazione, si attivano i tasti supplementari Snap (Istantanea), Line (linea), Rectangle (rettangolo) e Text (testo). Con questi tasti, l'immagine caricata nella finestra di visualizzazione Viewer può essere copiata nella pagina di presentazione, alcuni settori dell'immagine copiata possono essere evidenziati con linee e rettangoli, e si può inserire una didascalia in un campo di testo.

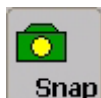
& vedi Tracciare una linea (pagina 253)
& vedi Tracciare un rettangolo (pagina 253)
& vedi Creare un campo di testo (pagina 254)

Se si tiene il puntatore sulla pagina di presentazione e poi si fa clic sul tasto destro del mouse, compare un menu contestuale che offre i seguenti comandi:

Comando	Funzione
Line	Nella pagina di presentazione viene inserita una linea nel formato preimpostato.
Rectangle	Nella pagina di presentazione viene inserito un rettangolo nel formato preimpostato.
Text	Nella pagina di presentazione viene inserito un campo di testo nel tipo di carattere preimpostato.
Zoom	Si può scegliere tra quattro visualizzazioni di grandezza della pagina di presentazione.
Grid	Nella pagina di presentazione si apre una rete di linee a reticolo non stampabile.

I comandi Line, Rectangle e Text non sono presenti solo nel menu contestuale, ma possono essere attivati anche con gli specifici tasti separati.

Una volta salvate, le pagine di presentazione hanno la terminazione di file *.ano.

Copiare un'immagine nella pagina di presentazione

Funzione

Facendo clic sul tasto Snap (Scatta), l'immagine caricata nella finestra di visualizzazione Viewer viene copiata nella pagina di presentazione. Contrassegnando l'immagine copiata e facendo poi clic sul tasto destro del mouse, compare un menu contestuale che suggerisce i seguenti comandi:

Comando	Funzione
Original size	L'immagine viene visualizzata nella sua grandezza originale.
Fit to page	L'immagine viene ingrandita in base alla grandezza della pagina di presentazione.
Bring to front	L'immagine viene portata a scatti in primo piano.
Send to back	L'immagine viene spostata a scatti sul retro.
Delete	L'immagine viene cancellata.

La grandezza dell'immagine può essere modificata a piacere tirando su un punto di presa dell'immagine con il puntatore. Per spostare l'immagine senza modificarne la grandezza, è sufficiente marcare l'immagine e spostarla tenendo premuto il tasto sinistro del mouse.

Il tasto Snap può essere attivato solo dopo aver aperto una pagina di presentazione con il tasto Annotation e fatto poi clic sulla finestra di visualizzazione Viewer.

Tracciare una linea nella pagina di presentazione

Funzione

Con il tasto Line (Linea) si traccia una linea nella pagina di presentazione. Nella pagina di presentazione, fare clic sul punto in cui deve iniziare la linea. Tenere premuto il tasto sinistro del mouse e tirare il puntatore lungo la pagina fino al punto in cui la linea deve terminare. Marcando la linea e poi facendo clic sul tasto destro del mouse, compare un menu contestuale che suggerisce i seguenti comandi:

Comando	Funzione
Style	In una finestra di dialogo si possono impostare il tipo di linea, lo spessore e la relativa lunghezza.
Color	In una finestra di dialogo si può selezionare un colore di preferenza per la linea.
Bring to front	La linea viene spostata a scatti in primo piano.
Send to back	La linea viene spostata a scatti sul retro.
Delete	La linea viene cancellata.

La lunghezza della linea può essere modificata tirando su uno dei punti di presa della linea stessa con il puntatore. Per spostare la linea senza modificarne la grandezza, fare clic sul punto di presa centrale e spostare la linea tenendo premuto il tasto sinistro del mouse.

Il tasto Line può essere attivato solo dopo aver aperto una pagina di presentazione con il tasto Annotation.

Tracciare un rettangolo nella pagina di presentazione

Funzione

Con il tasto Rectangle (Rettangolo) si traccia un rettangolo nella pagina di presentazione. Fare clic sul punto della pagina di presentazione in cui deve trovarsi un angolo del rettangolo. Tenendo premuto il tasto sinistro del mouse, tirare il puntatore attraverso la pagina per determinare la grandezza del rettangolo. Se si marca il rettangolo e poi si fa clic sul tasto destro del mouse, compare un menu contestuale dove vengono suggeriti i seguenti comandi:

Comando	Funzione

Style	In una finestra di dialogo si possono impostare tipo e spessore della linea, così come altre opzioni.
Color	In una finestra di dialogo, si può selezionare un colore a scelta per il rettangolo.
Bring to front	Il rettangolo viene portato a scatti in primo piano.
Sent to back	Il rettangolo viene spostato a scatti sul retro.
Delete	Il rettangolo viene cancellato.

La grandezza del rettangolo può essere modificata tirando uno dei punti di presa del rettangolo con il puntatore. Per spostare il rettangolo senza modificarne la grandezza, fare clic al centro del rettangolo e spostarlo tenendo premuto il tasto sinistro del mouse.

Il tasto Rectangle può essere attivato solo dopo aver aperto una pagina di presentazione con il tasto Annotation.

Inserire un campo di testo nella pagina di presentazione

Funzione

Con il tasto Text (Testo), si inserisce un campo di testo nella pagina di presentazione. Fare clic sul punto della pagina di presentazione in cui deve trovarsi il campo di testo. Tenendo premuto il tasto sinistro del mouse, tirare il puntatore attraverso la pagina per definire la grandezza del campo di testo. Se si marca il campo di testo e poi si fa clic sul tasto destro del mouse, compare un menu contestuale che offre i seguenti comandi:

Comando	Funzione
Font	In una finestra di dialogo si possono selezionare diversi tipi di caratteri e ulteriori formattazioni.
Transparent	Lo sfondo traspare dal campo di testo.
Bring to front	Il testo viene portato a scatti in primo piano.
Send to back	Il testo viene spostato a scatti sul retro.
Delete	Il testo viene cancellato.

La grandezza del campo di testo può essere modificata tirando uno dei punti di presa del campo di testo con il puntatore. Per spostare il campo di testo senza modificarne la grandezza, fare clic al centro del campo e spostarlo tenendo premuto il tasto sinistro del mouse.

Il tasto Text può essere attivato solo dopo aver aperto una pagina di presentazione con il tasto Annotation.

Stampare

Funzione
Il comando di stampa può essere attivato o con il tasto Print (Stampa) oppure tramite la finestra di dialogo Printer Selection (Selezione stampante). Per aprire questa finestra di dialogo, selezionare l'opzione Print nel menu File. Si può stampare l'immagine caricata nella finestra di visualizzazione Viewer oppure una pagina di presentazione.

Attivando il comando di stampa con il tasto Print, l'immagine caricata nella finestra di visualizzazione o la pagina di presentazione viene stampata con la stampante preimpostata e nella rappresentazione di pagina preimpostata. Queste impostazioni standard possono essere modificate a piacere nella finestra di dialogo Printer Selection. A questo scopo si possono comandare i seguenti pulsanti nella finestra di dialogo:

Pulsante	Funzione
Printer setup	Apre una finestra di dialogo in cui è possibile cambiare la stampante e le relative impostazioni.
Print	L'immagine o la pagina di presentazione viene stampata.
Background color	Apre una finestra di dialogo in cui si può selezionare un colore di sfondo pagina a scelta.
Center on page	L'immagine viene collocata al centro della pagina.
Fit to page	La grandezza dell'immagine viene adattata rispetto alla grandezza dell'area di stampa.
Aspect ratio	Il rapporto tra altezza e larghezza dell'immagine viene conservato anche con cambiamenti dell'altezza e della larghezza.

Nel campo Image (Immagine) è possibile modificare l'altezza (Size Y) e la larghezza (Size X) dell'immagine, e definire un margine di stampa verso l'alto (Offset Y) e un margine di stampa verso sinistra (Offset X). Le dimensioni dell'immagine e i margini di stampa non possono essere modificati una volta azionato con un clic il pulsante Fit to page. Se si è azionato con un clic il pulsante Center on Page, non si possono modificare solo i margini di stampa.

Con l'anteprima della pagina di stampa visualizzata nel campo Print Preview (Anteprima di stampa), è possibile controllare il risultato delle modifiche apportate. Nel campo Page (Pagina) viene indicata l'altezza e la larghezza dell'area di stampa (che non equivale al formato della carta). Nelle due ultime linee della finestra di dialogo, viene indicata la stampante correntemente in uso e il formato carta impostato.

Se si esce dalla finestra di dialogo Printer Selection dopo aver confermato con OK, tutte le impostazioni nella finestra di visualizzazione attiva Viewer vengono salvate. In questo modo, per immagini diverse, si possono salvare un'impostazione di stampante e una visualizzazione di pagina differenti. Tuttavia, una volta usciti dal software Leica Confocal, queste impostazioni vengono perse.

Trattamento dati

Aprire un file

Funzione
Nel Leica Confocal Software, con il tasto Open (Apri) si possono aprire formati di file diversi.

Formato di file	Descrizione
Esperimento (*.lei)	Un formato dati binario specifico della Leica. Durante la lettura dell'esperimento, si possono caricare non solo i dati immagine ma anche le impostazioni sperimentali.
Pagina di presentazione (*.ano)	Un formato dati binario specifico della Leica. Gli elementi inseriti nelle pagine di presentazione, come immagini, testi e grafiche, sono presenti ciascuno come singoli oggetti.
File tiff (*.tif)	Si tratta di file immagine Leica in formato single- e multi-tiff. Possono essere letti anche file esterni in formato RGB-tiff.

& vedi Creare un esperimento (pagina 257)
& vedi Creare una pagina di presentazione (pagina 252)

Salvare un file

Funzione
Facendo clic sul tasto Save (Salva), vengono salvati tutti i dati dell'attuale esperimento (*.lei) o dell'attuale pagina di presentazione (*.ano).

Quando si salva per la prima volta un esperimento o una pagina di presentazione tramite il tasto Save, compare dapprima la finestra di dialogo Save As (Salva con nome).

Spesso, con la funzione Save, i dati originali vengono inavvertitamente sovrascritti. Ciò può essere evitato utilizzando la funzione Save As e salvando così un esperimento già salvato con un altro nome.

& vedi Salvare un file con nome (pagina 256)

Salvare un file con nome

Funzione
Con il tasto Save As (Salva con nome) è possibile salvare un esperimento (*.lei) o una pagina di

presentazione (*.ano) con un determinato nome di file e in un determinato formato di file.

Quando si salva un esperimento, a livello di file si crea una cartella con il nome dell'esperimento. Nella sottodirectory di questa cartella si trova il file descrittivo (*.lei) dell'esperimento insieme ai singoli file immagine. Il file descrittivo ha un formato dati binario specifico della Leica. In questo file vengono registrate le impostazioni dei parametri e le informazioni cromatiche salvate sotto forma di tabelle di classificazione cromatica relative a ciascuna immagine dell'esperimento in questione.

I file immagine di un esperimento possono essere salvati in formato *tif* oppure in formato *raw*. Nel formato standard *tif* sono contenute le impostazioni sperimentali e le informazioni cromatiche di un'immagine in modo ancora ridondante. Nel formato *raw* vengono salvati soltanto i dati immagine.

Applicazioni tipiche
Il vantaggio del formato *raw* è rappresentato dalle minori dimensioni del file, che però hanno effetto solo con riprese aventi una quantità di dati relativamente piccola. Se, ad esempio, si riprende una serie di immagini avente un gran numero di fotogrammi in un formato di scansione ridotto, la serie può essere salvata e aperta più velocemente in formato *raw* piuttosto che in formato *tif*.

Salvare tutti i file

Funzione
Con il tasto Save All (Salva tutti), si possono salvare più esperimenti (*.lei) e pagine di presentazione (*.ano) in successione con un determinato nome di file e in un formato di file specifico.

Quando si salva un esperimento, a livello di file si crea una cartella con il nome dell'esperimento. Nella sottodirectory di questa cartella si trova il file descrittivo (*.lei) dell'esperimento insieme ai singoli file immagine. Il file descrittivo ha un formato dati binario specifico della Leica. In questo file vengono registrate le impostazioni dei parametri e le informazioni cromatiche salvate sotto forma di tabelle di classificazione cromatica relative a ciascuna immagine dell'esperimento in questione.

I file immagine di un esperimento possono essere salvati in formato *tif* oppure in formato *raw*. Nel formato standard *tif* sono contenute le impostazioni sperimentali e le informazioni cromatiche di un'immagine in modo ancora ridondante. Nel formato *raw* vengono salvati soltanto i dati immagine.

Applicazioni tipiche
Il vantaggio del formato *raw* è rappresentato dalle minori dimensioni del file, che però hanno effetto solo con riprese aventi una quantità di dati relativamente piccola. Se, ad esempio, si riprende una serie di immagini avente un gran numero di fotogrammi in un formato di scansione ridotto, la serie può essere salvata e aperta più velocemente in formato *raw* piuttosto che in formato *tif*.

Creare un esperimento

Funzione
Facendo clic sul tasto New Experiment (Nuovo esperimento), si apre una nuova finestra di visualizzazione Viewer e quindi viene creato un nuovo esperimento. Un esperimento è un file che può essere formato da più fotogrammi o serie di immagini. In questo modo più immagini riprese con parametri di scansione diversi o immagini finali di elaborazioni grafiche possono essere riassunte in un esperimento. Gli esperimenti (*.lei) hanno un formato di file specifico della Leica.

Adattamenti specifici per l'utente

Gestire funzioni tramite la console di comando

Funzione
Durante una ripresa, è spesso necessario reimpostare diversi parametri: con l'ausilio della console di comando, le funzioni possono essere gestite direttamente e rapidamente. Alle manopole della console di comando è possibile assegnare liberamente una serie di funzioni:

▶	Nel menu View (Visualizza) scegliere l'opzione Status Bars (Barre di stato) e poi Control Panel Status Bar (Barra di stato del pannello di controllo).

La barra di stato per la console di comando viene visualizzata sull'estremità inferiore dell'interfaccia utente del Leica Confocal Software. Vista da sinistra a destra, la barra di stato è costituita dal simbolo per la console di comando, dai sette campi che rappresentano le tre manopole della console di comando e da tre pulsanti.

▶	Fare clic su uno dei campi disposti come le manopole della console di comando.
▶	Si apre una lista in cui si può selezionare la funzione desiderata. Nel campo compare il nome della funzione assegnata.

La sensibilità di risposta delle manopole può essere modificata:

▶	Nella barra di stato della console di comando fare clic su un parametro di ripresa <u>con il tasto destro del mouse</u>.
▶	Per i parametri di ripresa Phase (Fase), Pinhole (Foro stenopeico), Scan Field Rotation (Rotazione campo di scansione) e Zoom si possono selezionare tre diversi livelli di sensibilità tra Smooth (Piano), Moderate (Moderato) e Rough (Rugoso).
▶	Per i parametri di ripresa Gain (Guadagno), Offset, Smart Gain (Guadagno evoluto) e Smart Offset (Offset evoluto), si può modificare il numero di volt per giro della manopola.
▶	Per i parametri di ripresa Z Position (Posizione Z) e Z Wide Position (Posizione in ampiezza Z) si può modificare il numero di micrometri per giro della manopola.

È possibile trovare ulteriori informazioni su questo argomento nella Guida in linea separata Tutorials (Esercizi per l'utilizzo del Leica Confocal Software)

Quando è stata assegnata una funzione a tutte le manopole, questa configurazione può essere salvata come modello.

▶	Fare clic sul pulsante a sinistra dei tre bottoni che si trovano sul margine destro della barra di stato.
▶	Si apre una finestra di dialogo dove si attribuisce un nome alla configurazione e questa può essere salvata.
▶	Fare clic sul pulsante centrale per selezionare e caricare una configurazione.

Oltre a queste configurazioni definite dall'utente, si può accedere anche ad altre configurazioni predefinite in fabbrica:

▶	Fare clic sul pulsante a destra dei tre bottoni che si trovano sul margine destro della barra di stato.

▶	Si apre una finestra di dialogo che riporta un elenco di tutte le configurazioni per la console di comando.

Le configurazioni preimpostate, contrassegnate con **L** (Leica), possono solo essere caricate, ma non modificate. Le configurazioni definite dell'utente si trovano nel campo d'elenco sotto User (utente) e sono contrassegnate con una **U** (User). Facendo clic su una di queste configurazioni e infine sul tasto destro del mouse, vengono proposti i seguenti comandi in un menu contestuale:

Comando	Funzione
Set as default template	La configurazione viene caricata come impostazione standard durante l'avvio del software.
Remove default setting	La configurazione come impostazione standard viene annullata.
Load (carica)	La configurazione viene caricata.
Rename (solo con **U**)	La configurazione può essere rinominata.
Delete (solo con **U**)	La configurazione viene cancellata.

Salvare la finestra di visualizzazione Viewer come modello

Funzione
Con il tasto Template (Modello), una configurazione personalizzata della finestra di visualizzazione Viewer può essere salvata come modello. Gli elementi attivabili o disattivabili nella finestra di visualizzazione Viewer sono i tastierini, le barre colori delle tabelle di classificazione cromatica e la legenda Experiment (Esperimento).

& vedi Finestra di visualizzazione Viewer (pagina 183)

Facendo clic sul tasto Template, si apre una finestra di dialogo dove si inserisce il nome da attribuire al modello. Questa configurazione della finestra di visualizzazione Viewer viene salvata e caricata ogni volta che si apre un file o si crea un nuovo esperimento.

Integrazione
Nel menu Tools (Strumenti), fare clic su Options (Opzioni) per poter accedere ai modelli preimpostati e personalizzati contenuti nel registro Viewer Template (Modello di visualizzazione). Nel campo d'elenco Leica Templates (Modelli Leica), sono disponibili i seguenti modelli:

Viewer Template	Configurazione
Viewer (Pure)	La finestra di visualizzazione è costituita solo dalla finestra immagine.
Viewer (LUT)	La finestra di visualizzazione è costituita dalla finestra immagine e dalle barre colori delle tabelle di classificazione cromatica.
Viewer (Standard)	La finestra di visualizzazione è costituita dai tastierini, dalla finestra immagine, dalle barre colori delle tabelle di classificazione cromatica e dalla legenda Experiment.

Nel campo d'elenco Personal Templates (Modelli personalizzati) vengono registrati i modelli definiti dall'utente. Con i pulsanti Add Active Viewer (Aggiungi visualizzazione attiva) e Remove Template (Rimuovi modello), si può salvare un nuovo modello o cancellarne uno esistente.

Nel menu Tools, fare clic su Options per stabilire se ed, eventualmente, quante finestre di visualizzazione Viewer debbano essere aperte con l'avvio del Leica Confocal Software nel registro Workspace (Spazio di lavoro).

Pacchetti software opzionali

Materials (opzionale)

Questo pacchetto software opzionale non fa parte del pacchetto base del programma. È però possibile ottenerlo presso la propria filiale Leica o presso un rivenditore autorizzato.

Misurazioni di rugosità lungo un segmento

Funzione
Con la funzione Roughness Profile (Profilo di rugosità), si misurano le altezze, le distanze e gli angoli di una superficie lungo un segmento, e i valori vengono poi rappresentati in una curva. Il profilo di altezza viene misurato dal record di dati selezionato nella finestra di visualizzazione Viewer. Questo record di dati dovrebbe essere una serie spaziale.

Condizione per la creazione del profilo di altezza è un'immagine topografica. Il tasto Roughness Profile, quindi, si attiva soltanto dopo aver creato un'immagine topografica del record di dati tramite il tasto Topography (topografia). Si può sempre quantificare solo un canale di rilevamento.

& vedi Creare un'immagine topografica (pagina 212)

▶	Fare clic sul tasto Roughness Profile. Nella finestra di visualizzazione Viewer, il segmento di misura viene rappresentato nell'immagine come una linea bianca. La lunghezza e la posizione del segmento di misura possono essere modificate a piacere facendo clic sul segmento e, con il tasto sinistro del mouse premuto, portando i punti di presa alla posizione desiderata.
▶	Si apre automaticamente una finestra di visualizzazione in cui compaiono la curva di misurazione per ogni canale di rilevamento e i valori statistici.

Parametro	Significato	Formula
Evaluation length: l(P)	Lunghezza del segmento di misura marcato secondo DIN EN ISO 4287	$L=\sqrt{(x_2-x_1)^2+(y_2-y_1)^2}$
Max. Peak: Pp	Altezza del vertice più alto del profilo (riferito all'altezza media) secondo DIN EN ISO 4287	Max (Pp)
Min. Valley: Pv	Profondità della valle maggiore del profilo (riferita all'altezza media) secondo DIN EN ISO 4287	Min (Pv)
Deviation: Pa	Media aritmetica dell'ordinata del profilo all'interno del segmento di misura (altezza media) secondo DIN EN ISO 4287	$P_a=\frac{1}{l}\int_0^l \lvert Z(x)\rvert dx$ con $Z(x)=Z_i-\overline{Z}$
RMS: Pq	Media quadratica dell'ordinata del profilo all'interno del segmento di misura secondo DIN EN ISO 4287	$P_q=\sqrt{\frac{1}{l}\int_0^l \lvert Z^2(x)\rvert dx}$

		con $Z(x) = Z_i - \bar{Z}$

I seguenti 4 valori di misura compaiono solo se nella finestra di dialogo Viewer Options è selezionata la funzione Misurazione di due punti

▶	Selezionare il menu View, opzione Experiment Overview, icona Charts. & vedi Finestra di dialogo Viewer Options, icona Charts (pagina 188)
▶	Nel campo Measurement (misurazione), la misurazione di due punti può essere attivata o disattivata selezionando 2 Point (due punti) o Off.

Parametro	Significato	Formula
h (posizione del punto di misura sinistro del cursore)	Altezza del profilo sulla posizione del punto di misura sinistro del cursore	h_1 ($l_{1)}$
h (posizione del punto di misura destro del cursore)	Altezza del profilo sulla posizione del punto di misura destro del cursore	h_2 ($l_{2)}$
Step Height dh	Differenza di altezze del profilo tra il punto di misura sinistro e destro del cursore	$\lvert h_2 - h_1 \rvert$
dx	Distanza tra il punto d'angolo sinistro e destro del cursore	$\lvert l_2 - l_1 \rvert$
alpha	Angolo tra la linea di collegamento del punto di misura sinistro e destro rispetto alla linea orizzontale	$\arctan\left(\frac{dh}{dx}\right)$

Salvataggio dei valori di misura
I valori delle posizioni dei due punti di misura, così come la differenza di altezze tra i due punti, possono essere salvati dal software.

▶	Selezionare il menu View, opzione Experiment Overview, icona Surface Measure. & vedi Finestra di dialogo Viewer Options, icona Surface Measure (pagina 194)
▶	Nel campo Multipoint Measurement (misurazione di più punti), fare clic sul pulsante Remember (Ricorda) per salvare i valori. Con il pulsante Clear (Cancella) questi vengono di nuovo cancellati.

Questa funzione di quantificazione è solo offline, è cioè disponibile solo per i record di dati già registrati.

Misurazioni di rugosità all'interno di un campo di analisi (ROI)

Funzione
Con la funzione Roughness Area (Area di rugosità), si misurano le altezze, le distanze e gli angoli di una superficie all'interno di un campo di analisi. Il profilo viene misurato dal record di dati selezionato nella finestra di visualizzazione Viewer. Questo record di dati dovrebbe essere una serie spaziale.

Condizione per la creazione del profilo di altezza è un'immagine topografica. Il tasto Roughness Area, quindi, si attiva soltanto dopo aver creato un'immagine topografica del record di dati tramite il tasto Topography (topografia).
& vedi Creare un'immagine topografica (pagina 212)

▶	Fare clic sul tasto Roughness Area e marcare un campo di analisi (ROI) nell'immagine. I tasti con i quali si definisce un campo di analisi si attivano con il tasto Roughness Area. & vedi Definire un campo di analisi (ROI) come ellisse (pagine 246) & vedi Definire un campo di analisi (ROI) come poligono & vedi Definire un campo di analisi (ROI) come rettangolo & vedi Definizione automatica del campo di analisi (ROI) & vedi Marcare e spostare un campo di analisi (ROI) & vedi Cancellare campi di analisi (ROI)
▶	Si apre automaticamente una finestra di visualizzazione in cui vengono visualizzati i valori statistici.

Parametro	Significato	Formula
# Pixel	Numero di pixel all'interno del campo di analisi selezionato	
Area	Area	$A = \int_0^A d_A\, A$
Avg. Height	Altezza media dell'ordinata del profilo	$H = \frac{1}{A}\int_0^A Z(x,y)\,dA$
Pa	Media aritmetica dell'ordinata del profilo all'interno del segmento di misura (altezza media) secondo DIN EN ISO 4287	$P_a = \frac{1}{A}\int_0^A \lvert Z(x,y)\rvert\,dA$ con $Z(x,y) = Z_i - \bar{Z}$
RMS (Pq)	Media quadratica dell'ordinata del profilo all'interno del segmento di misura secondo DIN EN ISO 4287	$Pq = \sqrt{\frac{1}{A}\int_0^A \lvert Z^2(x,y)\rvert\,dA}$ con $Z(x,y) = Z_i - \bar{Z}$
Min Valley (Pv)	Altezza minima dell'ordinata del profilo (riferita all'altezza media)	Min (Pv)
Max Peak (Pp)	Altezza massima dell'ordinata del profilo (riferita all'altezza media)	Max (Pp)

Questa funzione di quantificazione è solo offline, è cioè disponibile solo per i record di dati già registrati.

Filtri lineari e filtri morfologici (opzionale)

In questo capitolo si trovano i seguenti temi:

- Struttura e controllo della fase operativa Process
- Cosa sono i filtri lineari?
- Navigazione: Image Filters\ Linear Filters
- Cosa sono i filtri morfologici?
- Navigazione: Image Filters\ Morphological Filters

Struttura e controllo della fase operativa Process

Facendo clic sul simbolo di freccia Process (Processo), la normale struttura dell'interfaccia di comando viene completamente modificata. Tutti i tasti di funzione degli altri campi pulsanti/fasi operative si disattivano. Sul lato sinistro viene mostrata la finestra di visualizzazione Experiment Overview (Panoramica esperimento) **(1)** con gli esperimenti aperti. Più in basso si trova la finestra di navigazione **(2)** con l'albero di directory di tutte le funzioni disponibili in questa fase operativa. Al centro dell'interfaccia di comando compaiono 10 grandi zone pagina **(3)** che comprendono 10 moduli. Al di sopra di queste zone pagina si trova un campo di aiuto **(4)**, dove, tenendo il puntatore su una determinata zona pagina, è possibile visualizzare una breve spiegazione del relativo modulo.

▶	Fare clic sulla zona pagina contenente il modulo desiderato. Ad ogni livello di navigazione, puntando il mouse su una specifica zona pagina, si visualizza una spiegazione dei moduli in alto, nel campo di aiuto.
▶	Nei livelli di navigazione successivi, scegliere ogni volta una zona pagina fino a raggiungere la funzione desiderata con la relativa finestra di dialogo all'ultimo livello.
▶	Nella finestra di navigazione si può scegliere direttamente una funzione facendo clic sulla cartella corrispondente.

Nella riga di menu in alto a destra vengono suggeriti i seguenti tasti **(5)**:

▶	Fare clic sul tasto Back (Indietro) per ritornare all'ultimo livello di navigazione visualizzato.
▶	Fare clic sul tasto Forward (Avanti) per visualizzare il livello che si era selezionato prima di aver azionato con un clic il tasto Back.
▶	Fare clic sul tasto Up (Su) per portarsi al livello gerarchicamente superiore.
▶	Fare clic sul tasto Reset (Ripristina) per riportare le variabili modificate all'ultima impostazione.
▶	Per uscire dalla fase operativa Process (Processo), fare clic sul simbolo di freccia di un'altra fase operativa (per esempio, Acquire).

Nell'estremità inferiore di ogni finestra di dialogo si trovano questi due pulsanti:

▶	Fare clic sul pulsante Preview (Anteprima) per eseguire la funzione selezionata e visualizzare l'immagine finale a destra, nella finestra di anteprima.
▶	Fare clic sul tasto Apply (Applica) per applicare la funzione selezionata al record di dati immagine attivo, visualizzare l'immagine finale nella finestra di visualizzazione Viewer e creare un nuovo file nell'esperimento attivo.

Cosa sono i filtri lineari?
I filtri vengono utilizzati per migliorare la qualità di un'immagine. Di norma ciò significa rimuovere dall'immagine i punti grafici indesiderati (pixel). Con la funzione filtrante qui disponibile, quella di un filtro passa basso, nell'immagine viene soppresso il disturbo statistico che, ad esempio, può essere provocato dal rivelatore.

Il principio di un filtro è quello di compensare il valore di un pixel in un'immagine con i valori dei suoi pixel adiacenti. Il nucleo filtrante (Kernel) descrive il numero e la ponderazione dei pixel adiacenti che confluiscono nel calcolo del nuovo punto. Il nucleo filtrante qui utilizzato può essere descritto con il triangolo di Pascal:

Grandezza del nucleo filtrante	Triangolo di Pascal	Normalizzazione
	1 1	1/2
Kernel Size 3	1 2 1	1/4
	1 3 3 1	1/8
Kernel Size 5	1 4 6 4 1	1/16
	1 5 10 10 5 1	1/32
Kernel Size 7	1 6 15 20 15 6 1	1/64
	1 7 21 35 35 21 7 1	1/128
Kernel Size 9	1 8 28 56 70 56 28 8	1/256
...	1	...
	...	

Per esempio, selezionando un nucleo filtrante di grandezza 5 (Kernel Size 5), si usano ogni volta 5 pixel dell'immagine originale nel calcolo di 1 pixel dell'immagine filtrata. Il punto da calcolare è sempre il pixel centrale nel nucleo filtrante. I grigi dei 5 pixel, in base allo schema di ponderazione 1-4-6-4-1, vengono moltiplicati per i fattori 1/16, 4/16, 6/16, 4/16, 1/16, e sommati tra di loro fino ad ottenere il valore finale. Nella seguente rappresentazione schematica, questo implica che per il calcolo del pixel C i grigi dei pixel A, B e D, E confluiscono nel calcolo del pixel C' filtrato. 16x1/16 + 4x4/16 + 8x6/16 + 32x4/16 + 8x1/16 = 1 + 1 + 3 + 8 + 0,5 = 13,5.

	A	B	C	D	E
Grigi dei pixel A-E nell'immagine originale	16	4	8	32	8
Fattori della grandezza del nucleo filtrante 5	1/16	4/16	6/16	4/16	1/16
Grigio di C' nell'immagine filtrata			13,5		

Lo stesso calcolo viene eseguito per ogni pixel dell'immagine originale. Sul bordo dell'immagine si erge la maschera filtrante sull'immagine stessa. Per questi pixel viene impostato il valore 0.

Azione dei filtri lineari

Profilo di intensità di un'immagine non filtrata

Profilo di intensità dell'immagine dopo l'applicazione del filtro Blur

Profilo di intensità dell'immagine dopo l'applicazione del filtro Sharpen	Profilo di intensità dell'immagine dopo l'applicazione del filtro Highpass

- Selezionando il filtro Blur (Sfocatura), all'immagine viene applicato il filtro passa-basso descritto in precedenza. Questo tipo di filtro filtra le alte frequenze dall'immagine: ciò significa che le transizioni molto accentuate da intensità basse ad intensità elevate vengono attenuate. Con questo filtro, si possono togliere i disturbi da un'immagine.
- Selezionando il filtro Sharpen (Aumento definizione), all'immagine viene applicato il filtro passa-basso, quindi i valori dell'immagine filtrata in passa-alto vengono sommati ai valori dell'immagine originale. Questo tipo di filtro filtra le basse frequenze dall'immagine: ciò significa che le transizioni molto accentuate da intensità basse ad intensità elevate vengono amplificate.
- Selezionando il filtro passa-alto, all'immagine viene applicato il filtro passa-basso, quindi i valori dell'immagine originale vengono sottratti dai valori dell'immagine filtrata in passa-basso. Il risultato corrisponde ad un'immagine elaborata con un filtro passa-alto. Questo tipo di filtro rappresenta nell'immagine solo le transizioni molto accentuate da intensità basse ad intensità elevate.

Navigazione: Image Filters\ Linear Filters
Applicare filtri lineari (filtri passa-alto e passa-basso) ad immagini

- Nella finestra di visualizzazione Experiment Overview (Panoramica esperimento), selezionare il record di dati immagine da elaborare facendo doppio clic sul file.
- Selezionare uno dei tre tipi di filtro: Livellamento (Blur), Incremento definizione (Sharpen), Filtro passa-alto (Highpass).
- Nel campo Kernel Size (Grandezza del nucleo), selezionare un valore di grandezza del nucleo filtrante. Il valore, che viene indicato nel campo Kernel Size come Cut-off Wavelength (lunghezza d'onda limite), è la grandezza del filtro misurata in pixel. Questo valore viene calcolato in base ai parametri di scansione utilizzati per l'immagine specifica (ingrandimento dell'obiettivo, lunghezza d'onda della luce di eccitazione, formato di scansione, fattore di zoomata elettronico ...).
- Nel campo Filter Directions (Direzioni del filtro), impostare la dimensionalità del filtro. Selezionare gli assi spaziali a cui applicare il filtro in modo sequenziale. in questo caso vengono utilizzati filtri unidimensionali, ossia il filtro viene calcolato sempre solo su un asse alla volta. Il valore, che viene indicato nel campo Filter Directions come Cut-off Wavelength (Lunghezza d'onda limite), è la grandezza del filtro misurata in nanometri. Con un valore di 160 nm, per esempio, vengono filtrate tutte le lunghezze d'onda inferiori o uguali a 160 nm.

Sharp Factor (solo per il tipo di filtro Sharpen)

- Nel campo Sharp Factor, modificare con il cursore l'azione del tipo di filtro Sharp. Se questo fattore è impostato a 0, il filtro non è attivo.

Zone pagina Blur (Gallery), Sharpen (Gallery), Highpass (Gallery)

- Fare clic sulla zona pagina Blur (Gallery), Sharpen (Gallery) o Highpass (Gallery), per vedere una galleria di immagini di anteprima del record di dati immagine selezionato. Ogni immagine di anteprima è stata calcolata con una grandezza del nucleo filtrante diversa (e un fattore di definizione diverso). Fare clic su una zona pagina per visualizzare la finestra di dialogo con le relative impostazioni.

Cosa sono i filtri morfologici?

I filtri morfologici servono a modificare, mediante operatori matematici, la forma di strutture continue dell'immagine e a dividerle dallo sfondo. Gli operatori morfologici vengono normalmente applicati ad immagini binarie. Le immagini binarie sono caratterizzate da pixel aventi solo il valore 1 o 0. Nel Leica

Confocal Software, le immagini binarie possono essere create con le funzioni di segmentazione. Questi operatori consentono anche di creare immagini di grigi, ossia immagini aventi un campo di valori, per esempio, di 256 (8 bit) diversi grigi/ valori di intensità.

& vedi Fase operativa Process / cartella Segmentation (pagina 299)

Il principio è quello di muovere una maschera, definita anche elemento strutturale, pixel per pixel sopra l'immagine. Il pixel da analizzare è sempre il pixel centrale della maschera. Nel Leica Confocal Software, la maschera può avere la forma di un quadrato, di una croce o di un cerchio. La forma e la grandezza della maschera determinano quali e quanti pixel adiacenti debbano essere coinvolti per la filtrazione. In base ad un determinato criterio, si stabilisce quali pixel vengano definiti nell'immagine finale come struttura, e quali come sfondo. Per immagini binarie, questo criterio è rappresentato dalla connessione logica AND e OR, per immagini di grigi dal livello del grigio/ valore di intensità.

& vedi Operazioni booleane (pagina 306)

Con la forma della maschera si influenzano le strutture evidenziate nell'immagine finale. Se la forma della maschera è quella di una sfera, ad esempio, nell'immagine finale vengono marcate le forme rotonde. Tuttavia, il rapporto di vicinanza con cui il pixel specifico dell'immagine finale viene codificato come struttura o come sfondo è legato all'operatore morfologico.

Esistono questi due tipi fondamentali di operatori morfologici, cioè l'erosione (Erosion) e la dilatazione (Dilation), come pure combinazioni di questi operatori:

Operatore	**Descrizione**
Erosione (Erosion)	Con immagini binarie, il pixel analizzato nell'immagine finale viene impostato al valore binario 1 quando tutti i pixel adiacenti (in base alla forma e alla grandezza della maschera) nell'immagine binaria originale sono codificati con un 1. Con immagini di grigi, invece del valore del pixel analizzato nell'immagine finale, viene registrato il livello di grigio minimo dei pixel adiacenti.
Dilatazione (Dilation)	Con immagini binarie, il pixel analizzato nell'immagine finale viene impostato al valore binario 1, quando almeno uno dei pixel adiacenti (in base alla forma e alla grandezza della maschera) nell'immagine binaria di soglia è codificato con un 1. Con immagini di grigi, invece del valore del pixel analizzato nell'immagine finale, viene registrato il valore di intensità massimo dei pixel adiacenti.

Combinazione di operatori	**Descrizione**
Apri (Open)	Apri è una combinazione di operatori. Prima viene eseguita una erosione, poi una dilatazione.
Chiudi (Close)	Chiudi è una combinazione di operatori. Prima viene eseguita una dilatazione, poi una erosione.
Top Hat	Top Hat elabora l'immagine con la combinazione di operatori Apri ed estrae l'immagine finale dall'immagine originale.
Bottom Hat	Bottom Hat elabora l'immagine con la combinazione di operatori Chiudi ed estrae l'immagine originale dall'immagine finale.

Filtro	**Descrizione**
Median (mediana)	Il filtro Median appartiene al gruppo di filtri gerarchici non lineari. Con la filtrazione della mediana, i valori di intensità dei pixel adiacenti (in base alla forma e alla grandezza della maschera) vengono ordinati per grandezza. Nell'immagine finale della filtrazione di mediana, invece del pixel analizzato, viene poi registrato il valore di intensità che si trova al centro di questa gerarchia.

Azione degli operatori morfologici

Immagine originale	**Dopo l'applicazione del filtro Median**
Le strutture (con valori di intensità molto elevati) sono rappresentate cromaticamente in grigio, lo sfondo (valore di intensità 0) in blu scuro. Tra questi due valori estremi, l'intervallo tra intensità elevate e intensità basse è codificato in marrone, giallo, verde e turchese.	Il filtro Median sfoca l'intera immagine, accentuando e contornando al contempo le strutture presenti nella stessa.
Dopo l'applicazione dell'operatore Erosion (erosione)	**Dopo l'applicazione dell'operatore Dilation (dilatazione)**
Le strutture continue si restringono, le strutture minori e i collegamenti tra le strutture scompaiono (si abbassa il numero delle intensità elevate, mentre aumenta il numero delle intensità basse).	Si ingrandiscono le strutture continue e gli spazi intermedi all'interno di una struttura e tra le strutture vengono riempiti (aumenta il numero di intensità elevate, si abbassa quello delle intensità basse).
Dopo l'applicazione dell'operatore Open (Erosione + Dilatazione)	**Dopo l'applicazione dell'operatore Close (Dilatazione + Erosione)**
Le strutture continue si restringono e gli spazi intermedi diventano più grandi (si abbassa il numero di intensità elevate, mentre aumenta il numero delle intensità basse).	Si ingrandiscono le strutture continue e gli spazi intermedi rimangono quasi invariati (aumenta il numero di intensità elevate, mentre il numero delle intensità basse rimane all'incirca lo stesso).
Dopo l'applicazione dell'operatore Top Hat	**Dopo l'applicazione dell'operatore Bottom Hat**

Vengono estratte le intensità elevate	Vengono estratte le intensità basse

Navigazione: Image Filters\ Morphological Filters
Applicare filtri morfologici ad immagini

▶	Nella finestra di visualizzazione Experiment Overview (Panoramica esperimento), selezionare il record di dati immagine da elaborare facendo doppio clic sul file.
▶	Selezionare uno dei sette tipi di filtro: filtro di mediana (Median), erosione (Erosion), dilatazione (Dilation), Apri (Open), Chiudi (Close), Top hat e Bottom hat.
▶	Selezionare nel campo Mask (Maschera) la forma base della maschera filtro: quadrato (Cube), crocetta (Cross) o cerchio (Sphere). Con la selezione della forma dell'elemento strutturale, si influenzano le strutture dell'immagine ricavate dal filtro. I cerchi, per esempio, marcano le strutture rotonde dell'immagine finale.
▶	Nei campi Size X, Size Y e Size Z, indicare la grandezza della maschera in pixel. La grandezza della maschera determina quanti pixel adiacenti vengono inclusi nella maschera filtrante.
▶	Nel campo Repetition (ripetizione), stabilire la frequenza di applicazione del filtro.

Zone pagina con l'identificazione (Gallery)

▶	Fare clic su una della zone pagina contrassegnate con (Gallery/galleria) per vedere una galleria di immagini di anteprima del record di dati immagine selezionato. Ogni immagine di anteprima è stata calcolata con un elemento strutturale e/o una grandezza di maschera diversi. Fare clic su una zona pagina per visualizzare la finestra di dialogo con le relative impostazioni.

Livellamento e filtraggio di riprese di superficie

In questo capitolo si trovano i seguenti temi:

- Struttura e controllo della fase operativa Process
- Navigazione: Materials\ Leveling
- Cosa sono i filtri lineari?
- Navigazione: Materials\ Roughness Filter
- Navigazione: Materials\ Waviness Filter

Struttura e controllo della fase operativa Process

Facendo clic sul simbolo di freccia Process (Processo), la normale struttura dell'interfaccia di comando viene completamente modificata. Tutti i tasti di funzione degli altri campi pulsanti/fasi operative si disattivano. Sul lato sinistro viene mostrata la finestra di visualizzazione Experiment Overview (panoramica esperimento) **(1)** con gli esperimenti aperti. Più in basso si trova la finestra di navigazione **(2)** con l'albero di directory di tutte le funzioni disponibili in questa fase operativa. Al centro dell'interfaccia di comando compaiono 10 grandi zone pagina **(3)** che comprendono 10 moduli. Al di sopra di queste zone pagina si trova un campo di aiuto **(4)**, dove, tenendo il puntatore su una determinata zona pagina, è possibile visualizzare una breve spiegazione del relativo modulo.

▶	Fare clic sulla zona pagina contenente il modulo desiderato. Ad ogni livello di navigazione, puntando il mouse su una specifica zona pagina, si visualizza una spiegazione dei moduli in alto, nel campo di aiuto.
▶	Nei livelli di navigazione successivi, scegliere ogni volta una zona pagina fino a raggiungere la funzione desiderata con la relativa finestra di dialogo all'ultimo livello.
▶	Nella finestra di navigazione si può scegliere direttamente una funzione facendo clic sulla cartella corrispondente.

Nella riga di menu in alto a destra vengono suggeriti i seguenti tasti **(5)**:

▶	Fare clic sul tasto Back (Indietro) per ritornare all'ultimo livello di navigazione visualizzato.
▶	Fare clic sul tasto Forward (Avanti) per visualizzare il livello che si era selezionato prima di aver azionato con un clic il tasto Back.
▶	Fare clic sul tasto Up (Su) per portarsi al livello gerarchicamente superiore.
▶	Fare clic sul tasto Reset (Ripristina) per riportare le variabili modificate all'ultima impostazione.
▶	Per uscire dalla fase operativa Process (Processo), fare clic sul simbolo di freccia di un'altra fase operativa (per esempio, Acquire).

Nell'estremità inferiore di ogni finestra di dialogo si trovano questi due pulsanti:

▶	Fare clic sul pulsante Preview (Anteprima) per eseguire la funzione selezionata e visualizzare l'immagine finale a destra, nella finestra di anteprima.
▶	Fare clic sul tasto Apply (Applica) per applicare la funzione selezionata al record di dati immagine attivo, visualizzare l'immagine finale nella finestra di visualizzazione Viewer e creare un nuovo file nell'esperimento attivo.

Navigazione: Materials\ Leveling
Adattamento di una funzione di interpolazione ad un record di dati per la correzione di andamenti tendenziali (per esempio, un record di dati ripreso in modo asimmetrico)
Lo scopo del procedimento è quello di portare in posizione orizzontale un andamento di intensità che mostra una curva tendenziale. A tal fine, si procede anzitutto all'adattamento di una funzione di interpolazione adatta (polinomio) all'andamento tendenziale. Successivamente, viene calcolata la distanza della funzione di interpolazione ottimale rispetto ad un plateau di intensità orizzontale. Le differenze di intensità vengono poi sommate in pixel al record di dati originale. L'andamento tendenziale viene così compensato.

& vedi Funzione di adattamento per la correzione di andamenti tendenziali (pagina 304)

La funzione di destinazione da ottimizzare durante il calcolo dei coefficienti della funzione di adattamento è:

$$\int \| I - f(\Omega) \| d\Omega = \min$$

▶	Selezionare uno dei quattro tipi di funzione di adattamento: Leveling (Linear), Leveling (Bilinear), Leveling (Quadratic), Leveling (Cubic).

Fitting Interpolation Function (funzione di interpolazione di adattamento)	**Formula**
Linear	f(x) = a + bx + cy
Bilinear	f(x) = a + bx + cx + dxy
Quadratic	f(x) = a + bx + cx + dxy + fx^2
Cubic	f(x) = a + bx + cx + dxy + fx^2 + gxy^2 + hx^3 + iy^3

▶	Nella finestra di visualizzazione Experiment Overview (Panoramica esperimento), selezionare il record di dati immagine da elaborare facendo doppio clic sul file.
▶	Nel campo Sample Step Width (Ampiezza intervallo campione), selezionare l'ampiezza dell'intervallo. Con quest'ultima opzione si imposta il numero di nodi di interpolazione per il polinomio. Minore è l'ampiezza di intervallo impostata, più lungo e preciso è il calcolo della funzione di adattamento.
▶	Se il record di dati fosse disturbato, si consiglia di disattivare i segnali di disturbo di debole intensità impostando un valore di soglia nel campo Threshold (Soglia). Tutte le intensità di valore inferiore alla soglia non vengono utilizzate per il calcolo, evitando così che i segnali di disturbo siano erroneamente usati come nodi di interpolazione per la funzione di adattamento.

Cosa sono i filtri lineari?
I filtri vengono utilizzati per migliorare la qualità di un'immagine. Di norma ciò significa rimuovere dall'immagine i punti grafici indesiderati (pixel). Con la funzione filtrante qui disponibile, quella di un filtro passa basso, nell'immagine viene soppresso il disturbo statistico che, ad esempio, può essere provocato dal rivelatore.

Il principio di un filtro è quello di compensare il valore di un pixel in un'immagine con i valori dei suoi pixel adiacenti. Il nucleo filtrante (Kernel) descrive il numero e la ponderazione dei pixel adiacenti che confluiscono nel calcolo del nuovo punto. Il nucleo filtrante qui utilizzato può essere descritto con il triangolo di Pascal:

Grandezza del nucleo filtrante	Triangolo di Pascal	Normalizzazione
	1 1	1/2
Kernel Size 3	1 2 1	1/4
	1 3 3 1	1/8
Kernel Size 5	1 4 6 4 1	1/16
	1 5 10 10 5 1	1/32
Kernel Size 7	1 6 15 20 15 6 1	1/64
	1 7 21 35 35 21 7 1	1/128
Kernel Size 9	1 8 28 56 70 56 28 8 1	1/256
...	...	...

Per esempio, selezionando un nucleo filtrante di grandezza 5 (Kernel Size 5), si usano ogni volta 5 pixel dell'immagine originale nel calcolo di 1 pixel dell'immagine filtrata. Il punto da calcolare è sempre il pixel centrale nel nucleo filtrante. I grigi dei 5 pixel, in base allo schema di ponderazione 1-4-6-4-1, vengono moltiplicati per i fattori 1/16, 4/16, 6/16, 4/16, 1/16, e sommati tra di loro fino ad ottenere il valore finale. Nella seguente rappresentazione schematica, questo implica che per il calcolo del pixel C i grigi dei pixel A, B e D, E confluiscono nel calcolo del pixel C' filtrato. 16x1/16 + 4x4/16 + 8x6/16 + 32x4/16 + 8x1/16 = 1 + 1 + 3 + 8 + 0,5 = 13,5.

	A	B	C	D	E
Grigi dei pixel A-E nell'immagine originale	16	4	8	32	8
Fattori della grandezza del nucleo filtrante 5	1/16	4/16	6/16	4/16	1/16
Grigio di C' nell'immagine filtrata			13,5		

Lo stesso calcolo viene eseguito per ogni pixel dell'immagine originale. Sul bordo dell'immagine si erge la maschera filtrante sull'immagine stessa. Per questi pixel viene impostato il valore 0.

Azione dei filtri lineari

Profilo di intensità di un'immagine non filtrata

Profilo di intensità dell'immagine dopo l'applicazione del filtro Waviness

Profilo di intensità dell'immagine dopo l'applicazione del filtro Roughness

▶ Selezionando il filtro Waviness (Ondulazione), all'immagine viene applicato il filtro passa-basso descritto in precedenza. Questo tipo di filtro filtra le alte frequenze dall'immagine: ciò significa

	che le transizioni molto accentuate da intensità basse ad intensità elevate vengono attenuate. Con questo filtro, si possono togliere i disturbi da un'immagine.
▶	Selezionando il filtro Roughness (Irregolarità), all'immagine viene applicato il filtro passa-basso, quindi i valori dell'immagine originale vengono sottratti dai valori dell'immagine filtrata in passa-basso. Il risultato corrisponde ad un'immagine elaborata con un filtro passa-alto. Questo tipo di filtro rappresenta nell'immagine solo le transizioni molto accentuate da intensità basse ad intensità elevate.

Navigazione: Materials\ Roughness Filter
Applicare filtri passa-alto ad immagini

▶	Nella finestra di visualizzazione Experiment Overview (Panoramica esperimento), selezionare il record di dati immagine da elaborare facendo doppio clic sul file.
▶	Nel campo Kernel Size (Grandezza del nucleo), selezionare un valore di grandezza del nucleo filtrante. Il valore, che viene indicato nel campo Kernel Size come Cut-off Wavelength (Lunghezza d'onda limite), è la grandezza del filtro misurata in pixel. Questo valore viene calcolato in base ai parametri di scansione utilizzati per l'immagine specifica (Ingrandimento dell'obiettivo, lunghezza d'onda della luce di eccitazione, formato di scansione, fattore di zoomata elettronico ...).
▶	Nel campo Filter Directions (Direzioni del filtro), impostare la dimensionalità del filtro. Selezionare gli assi spaziali a cui applicare il filtro in modo sequenziale. in questo caso vengono utilizzati filtri unidimensionali, ossia il filtro viene calcolato sempre solo su un asse alla volta. Il valore, che viene indicato nel campo Filter Directions come Cut-off Wavelength, è la grandezza del filtro misurata in nanometri. Con un valore di 160 nm, per esempio, vengono filtrate tutte le lunghezze d'onda inferiori o uguali a 160 nm.

Navigazione: Materials\ Waviness Filter
Applicare filtri passa-basso ad immagini

▶	Nella finestra di visualizzazione Experiment Overview, selezionare il record di dati immagine da elaborare facendo doppio clic sul file.
▶	Nel campo Kernel Size, selezionare un valore di grandezza del nucleo filtrante. Il valore, che viene indicato nel campo Kernel Size come Cut-off Wavelength, è la grandezza del filtro misurata in pixel. Questo valore viene calcolato in base ai parametri di scansione utilizzati per l'immagine specifica (ingrandimento dell'obiettivo, lunghezza d'onda della luce di eccitazione, formato di scansione, fattore di zoomata elettronico ...).
▶	Nel campo Filter Directions, impostare la dimensionalità del filtro. Selezionare gli assi spaziali a cui applicare il filtro in modo sequenziale. in questo caso vengono utilizzati filtri unidimensionali, ossia il filtro viene calcolato sempre solo su un asse alla volta. Il valore, che viene indicato nel campo Filter Directions come Cut-off Wavelength, è la grandezza del filtro misurata in nanometri. Con un valore di 160 nm, per esempio, vengono filtrate tutte le lunghezze d'onda inferiori o uguali a 160 nm.

Misurazione di superfici e volumi

Funzione
Con la funzione Materials (Materiali) si calcolano le superfici e i volumi di un record di dati tridimensionale e spaziale.
Facendo clic sul tasto Materials, si apre automaticamente una finestra di visualizzazione dove vengono visualizzate una curva di misurazione e la grandezza del volume accumulato in base alla posizione z. Il volume accumulato indica che per ogni posizione z viene rilevato il valore del volume del record di dati sottostante.

Condizione per il calcolo delle superfici e dei volumi è un'immagine topografica. Il tasto Materials, quindi, si attiva soltanto dopo aver creato un'immagine topografica del record di dati con il tasto Topography (Topografia). Si può sempre quantificare solo un canale di rilevamento.

& vedi Creare un'immagine topografica (pagina 212)

Parametro	Significato
Scanned Area A	Questo valore rappresenta la proiezione orizzontale della superficie di una sezione xy.
Surface Area A'	Questo valore rappresenta la superficie effettiva di una sezione xy. Rispetto alla proiezione orizzontale, la superficie effettiva è sempre almeno altrettanto grande, in generale anche maggiore.
Ratio A'/A	Questo valore rappresenta il rapporto tra superficie e base. Maggiore è questo rapporto, tanta più superficie bidimensionale è incorporata nello spazio tridimensionale.

I seguenti 4 valori di misura compaiono solo se nella finestra di dialogo Viewer Options è selezionata la funzione Misurazione di due punti

▶	Selezionare il menu View, opzione Experiment Overview (Panoramica esperimento), icona Charts (Grafici). & vedi Finestra di dialogo Viewer Options, icona Charts (pagina 188)
▶	Nel campo Measurement (Misurazione), la misurazione di due punti può essere attivata o disattivata selezionando 2 Point (Due punti) o Off.

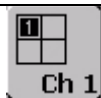
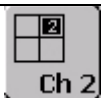
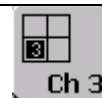
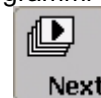
V(z<=valore di posizione superiore)	Questo valore rappresenta il volume che si trova al di sotto del valore di posizione superiore del calibro a corsoio (punto d'angolo destro del cursore)
V(z<=valore di posizione inferiore)	Questo valore rappresenta il volume che si trova al di sotto del valore di posizione inferiore del calibro a corsoio (punto angolo destro del cursore)
dV	Volume tra entrambi i valori di posizione del cursore
dz	Distanza tra entrambi i valori di posizione del cursore

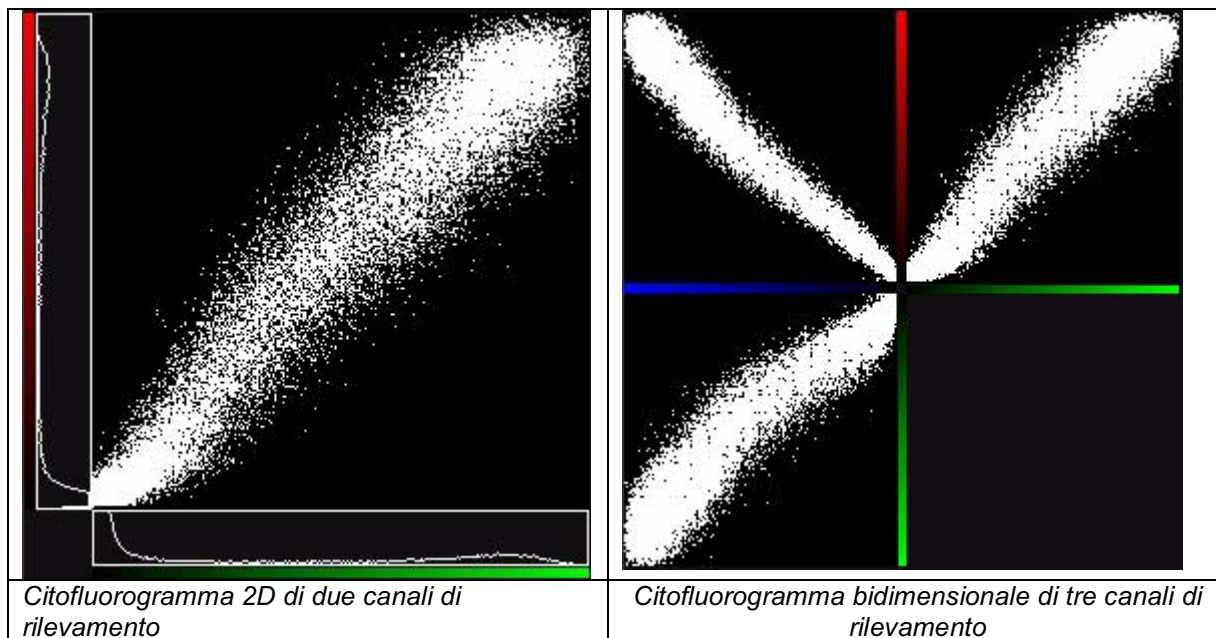
Questa funzione di quantificazione è solo offline, è cioè disponibile solo per i record di dati già registrati.

Multicolor (opzionale)

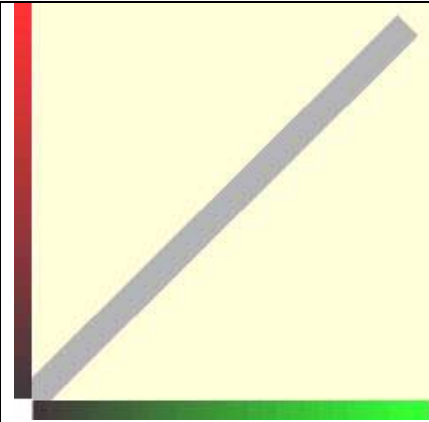
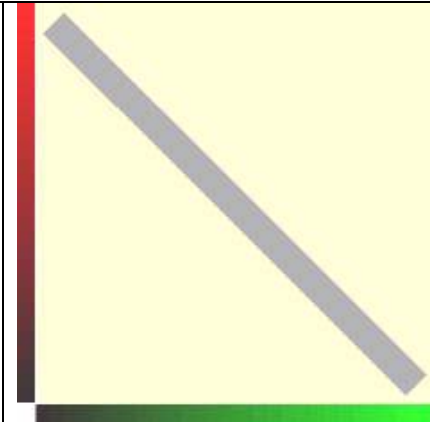
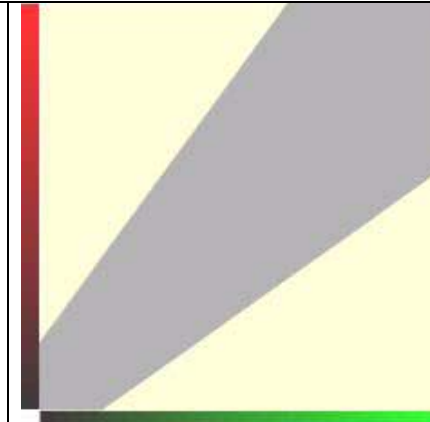
Questo pacchetto software opzionale non fa parte del pacchetto base del programma. È però possibile ottenerlo presso la propria filiale Leica o presso un rivenditore autorizzato.

Multicolor / Creare un citofluorogramma bidimensionale

In questa pagina vengono trattati i seguenti argomenti

- Creare il citofluorogramma bidimensionale di un record di dati immagine
- Impronte ed interpretazioni del citofluorogramma

Creare il citofluorogramma bidimensionale di un record di dati immagine
Con questa funzione si crea un citofluorogramma bidimensionale. Un citofluorogramma bidimensionale è un diagramma di punti che visualizza l'intera distribuzione dei valori di intensità di due canali di rilevamento. Ogni punto della nuvola di punti del citofluorogramma rappresenta una coppia di intensità di entrambi i canali di rilevamento. Nel citofluorogramma possono essere visualizzati i dati immagine di un massimo di tre canali di rilevamento.

Citofluorogramma 2D di due canali di rilevamento	*Citofluorogramma bidimensionale di tre canali di rilevamento*

► Fare clic sul tasto CF2D per creare un citofluorogramma bidimensionale del record di dati immagine attivo nella finestra di visualizzazione Viewer. Facendo clic su due canali di rilevamento, vengono rappresentate tutte le coppie di intensità presenti in una nuvola di punti bidimensionale. Con tre canali di rilevamento attivi, vengono rappresentate le coppie di intensità di 2 canali di rilevamento in tre nuvole di punti bidimensionali. Selezionando un solo canale di rilevamento, la distribuzione delle intensità viene rappresentata in un istogramma.

▶	Fare clic sul tasto Gallery (Galleria) per creare un citofluorogramma considerando tutte le immagini di una serie. Gall.
▶	Fare clic sul tasto Single (Singola) per utilizzare i fotogrammi attualmente rappresentati nella finestra di visualizzazione Viewer durante la creazione del citofluorogramma. Con i tasti Next (Successivo), Previous (Precedente) o Play si possono sfogliare le immagini della serie e i citofluorogrammi corrispondenti. Single Next Prev Play

I dati immagine di 3 canali di rilevamento possono essere rappresentati anche come un citofluorogramma tridimensionale.

& vedi Pacchetto Multicolor / Creare un citofluorogramma tridimensionale (vedi pagina 277)

Nella finestra di dialogo Viewer Options (Opzioni di visualizzazione) sono disponibili diverse opzioni per il citofluorogramma, che prevedono la possibilità di delimitare il campo delle intensità, variare la codificazione cromatica e visualizzare o nascondere gli elementi di visualizzazione del citofluorogramma.

& vedi Finestra di dialogo Viewer Options, icona Multicolor (vedi pagina 281)

Rappresentazione schematica delle possibili impronte del citofluorogramma

(a) *I dati immagine nel canale di rilevamento verde e in quello rosso sono correlati positivamente.*	*(b)* *I dati immagine nel canale di rilevamento verde e in quello rosso sono correlati negativamente.*	*(c)* *Dati immagine correlati positivamente e disturbi nei canali di rilevamento verde e rosso.*

(d) *I dati immagine e i disturbi nei canali di rilevamento verde e rosso sono indipendenti l'uno dall'altro.*	(e) *Diafonia ottica del canale di rilevamento verde nel canale rosso*	(f) *Dati immagine correlati e indipendenti e disturbi nel canale di rilevamento rosso e verde*

- Il diagramma **(a)** mostra una nuvola in cui i punti si concentrano in una linea retta nelle diagonali superficiali del citofluorogramma. La correlazione dei dati immagine di entrambi i canali di rilevamento è molto elevata e positiva. Vi è un rapporto tra i valori d'intensità nel canale verde e in quello rosso, in quanto un aumento nel canale verde corrisponde ad un aumento equivalente nel canale rosso. Tale impronta del citofluorogramma compare durante la colocalizzazione di coloranti fluorescenti.
- Il diagramma **(b)** mostra una nuvola in cui i punti si concentrano su una linea retta nelle diagonali superficiali del citofluorogramma. La correlazione dei dati immagine di entrambi i canali di rilevamento è molto elevata e negativa. Vi è un rapporto tra i valori d'intensità nel canale verde e in quello rosso, in quanto un aumento nel canale verde corrisponde ad un abbassamento equivalente nel canale rosso.
- Il diagramma **(c)** mostra una nuvola in cui i punti sono sparsi lungo un ampia superficie. Solo una parte relativamente piccola di punti, cioè quelli al centro della nuvola, si trovano nelle diagonali superficiali. Solo per questa parte si può presupporre un rapporto diretto tra le intensità di entrambi i canali. L'ampia diffusione della nuvola di punti indica la presenza di disturbi nel record di dati immagine.
- Il diagramma **(d)** mostra due nuvole di punti separate, in cui i punti sono sparsi rispettivamente su un'ampia superficie. Non si può riscontrare una correlazione dei dati immagine nei due canali di rilevamento, in quanto all'aumento in un canale corrisponde sempre e soltanto un aumento molto ridotto nell'altro canale. Ciascun canale di rilevamento rappresenta informazioni indipendenti sull'oggetto.
- Il diagramma **(e)** mostra due nuvole di punti separate in cui i punti sono sparsi rispettivamente su un'ampia superficie. La nuvola di punti del canale verde è inclinata nel senso delle diagonali volumetriche. Questa impronta del citofluorogramma indica una diafonia ottica del canale verde in quello rosso.
- Il diagramma **(f)** mostra, da un lato, due nuvole di punti separate, dall'altro, una nuvola di punti in cui i punti si concentrano nelle diagonali superficiali del citofluorogramma. Nei due canali di rilevamento sono presenti sia dati immagine correlati, sia informazioni indipendenti sull'oggetto.

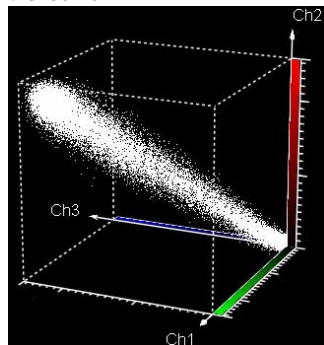
Con l'ausilio di una maschera binaria, una parte delle coppie di intensità può essere selezionata nel citofluorogramma e localizzata nelle immagini originali. Si rimanda alla descrizione del tasto Mask (maschera).

& vedi Multicolor / Visualizzare una colocalizzazione nell'immagine originale (vedi pagina 278)

Inoltre, è possibile calcolare e visualizzare diversi dati geometrici e densitometrici per l'immagine originale e per i dati immagine selezionati nel citofluorogramma.

& vedi Multicolor / Visualizzare i dati statistici (vedi pagina 280)

Multicolor / Creare un citofluorogramma tridimensionale

Con questa funzione si crea un citofluorogramma tridimensionale. Un citofluorogramma tridimensionale è un diagramma di punti che visualizza l'intera distribuzione delle intensità di tre canali di rilevamento. Ogni punto della nuvola del citofluorogramma rappresenta una triade di intensità dei tre canali.

▶	Fare clic sul tasto CF3D per creare un citofluorogramma tridimensionale del record di dati immagine attivo. La visualizzazione dei dati immagine con il citofluorogramma tridimensionale ha un senso solo se il record di dati immagine è stato acquisito in tre canali di rilevamento.
▶	Con i tasti Rotate (Ruota), Move (Sposta) e Zoom (Zooma), il citofluorogramma tridimensionale può essere ruotato, spostato, ingrandito e ridotto. & vedi Ruotare un'immagine tridimensionale (vedi pagina 214) & vedi Spostare un'immagine tridimensionale (vedi pagina 215) & vedi Zoomare su un'immagine tridimensionale (vedi pagina 215)

Ulteriori informazioni su possibili impronte ed interpretazioni del citofluorogramma si trovano nella descrizione del citofluorogramma bidimensionale.

& vedi Multicolor / Creare un citofluorogramma bidimensionale (vedi pagina 274)

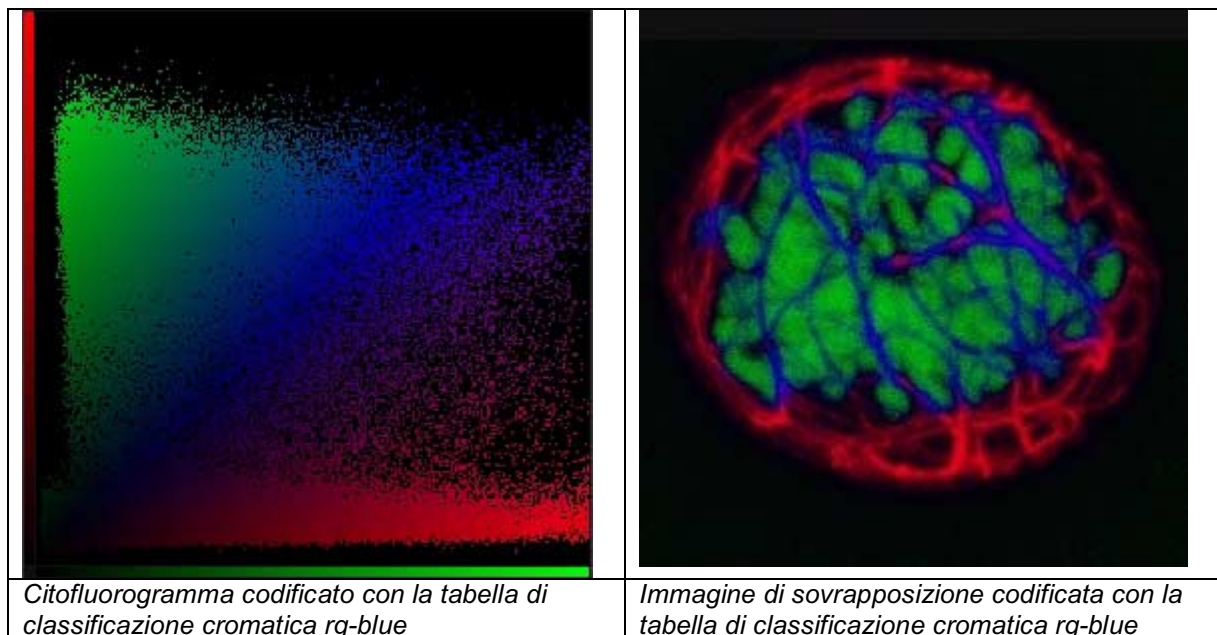
Nella finestra di dialogo Viewer Options (Opzioni di visualizzazione) sono disponibili diverse opzioni per il citofluorogramma, che prevedono la possibilità di delimitare il campo delle intensità, variare la codificazione cromatica e visualizzare o nascondere gli elementi di visualizzazione del citofluorogramma.

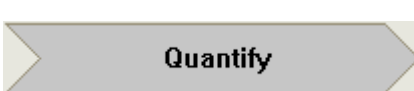
& vedi Finestra di dialogo Viewer Options, icona Multicolor (vedi pagina 281)

Multicolor / Visualizzare un'immagine di sovrapposizione

Funzione

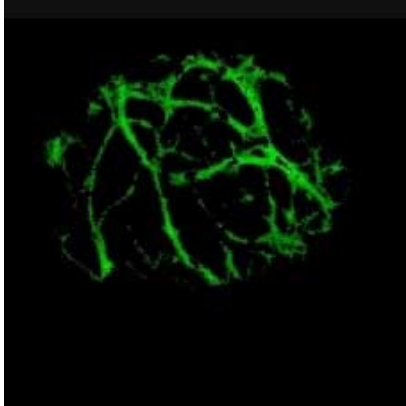
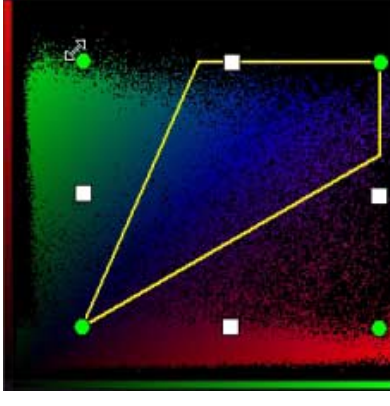
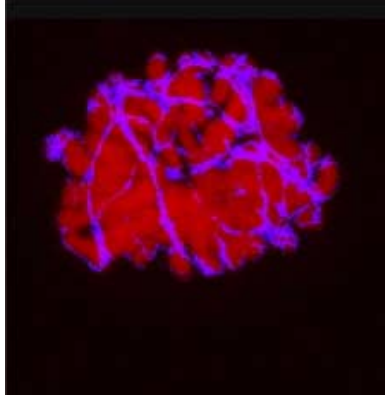
Attivando questo tasto, si crea un'immagine di sovrapposizione di tutti i canali di rilevamento attivi. A differenza dell'immagine di sovrapposizione convenzionale, qui c'è la possibilità di utilizzare tabelle di classificazione cromatica speciali sviluppate per il citofluorogramma, che evidenziano o attenuano con un particolare colore i punti nelle diagonali volumetriche del citofluorogramma. Con l'ausilio dell'immagine di sovrapposizione, si possono visualizzare le zone dell'immagine originale interessate da una colocalizzazione di coloranti di fluorescenza.

Citofluorogramma codificato con la tabella di classificazione cromatica rg-blue	*Immagine di sovrapposizione codificata con la tabella di classificazione cromatica rg-blue*

Le tabelle di classificazione cromatica si trovano nella finestra di dialogo Viewer Options (Opzioni di visualizzazione), icona Multicolor, registro Color, punto di selezione Binary with custom colors (Binaria con colori personalizzati).

& vedi Finestra di dialogo Viewer Options, icona Multicolor (vedi pagina 281)

Multicolor / Localizzare coppie di valori del citofluorogramma nell'immagine originale

Attivando il tasto Mask (Maschera), si crea una maschera binaria dei dati immagine del citofluorogramma. Questa funzione consente di selezionare determinate coppie di intensità del citofluorogramma e di localizzarle nell'immagine originale.

Selezionare coppie di intensità nel citofluorogramma e localizzarle nell'immagine originale

▶	Fare clic sul tasto CF2D per creare un citofluorogramma bidimensionale del record di dati immagine.

▶	Fare clic sul tasto Mask per creare una maschera binaria del citofluorogramma. Contemporaneamente si attivano i tasti con cui è possibile disegnare un campo di analisi (ROI).
▶	Fare clic sul simbolo di freccia Quantify (Quantifica) e su uno dei tasti ROI, per esempio il tasto Ellipse (Ellisse) o Polygon (Poligono), e disegnare un campo di analisi nel citofluorogramma.
	La selezione di dati nel citofluorogramma è sempre possibile solo con due canali di rilevamento attivi.Se sono attivi tre canali di rilevamento, i tasti ROI non possono essere attivati.
▶	Le combinazioni di intensità che si trovano all'interno del campo di analisi del citofluorogramma, vengono evidenziate cromaticamente nelle immagini originali.

Esempi
I dati immagine mascherati nell'immagine originale possono essere differenziati con codificazioni cromatiche diverse, isolati o sovrapposti alle immagini originali. Le relative impostazioni si trovano nella finestra di dialogo Viewer Options (Opzioni di visualizzazione), icona Multicolor, registro Mask (Maschera).

& vedi Finestra di dialogo Viewer Options, icona Multicolor (vedi pagina 281)

(1a) *Dati immagine nel canale verde*	*(1)* *Citofluorogramma bidimensionale di entrambi i canali*	*(1b)* *Dati immagine nel canale rosso*

(2a) *I dati immagine selezionati nel citofluorogramma vengono evidenziati in bianco nell'immagine originale* *(Punto di selezione: Image covered by mask)*	*(2)* *Citofluorogramma bidimensionale con coppie di intensità selezionate*	*(2b)* *I dati immagine selezionati nel citofluorogramma vengono evidenziati in bianco nell'immagine originale* *(Punto di selezione: Image covered by mask)*
(3a) *Solo i dati immagine selezionati nel citofluorogramma vengono rappresentati nella codificazione cromatica del canale* *(Punto di selezione: Masked image only)*	*(3)* *Citofluorogramma bidimensionale con coppie di intensità selezionate*	*(3b)* *I dati immagine selezionati nel citofluorogramma vengono evidenziati in blu nell'immagine originale* *(Punto di selezione: Image covered by blue mask)*

Multicolor / Visualizzare i dati statistici

Funzione

Attivando questo tasto, i dati statistici relativi alla geometria e alla densitometria dei dati immagine selezionati nel citofluorogramma e delle immagini originali vengono calcolati e riportati in una finestra di visualizzazione. Quando si definiscono campi di analisi nell'immagine originale con i tasti ROI, vengono calcolati dati statistici anche per questi campi.

Prima di poter calcolare e visualizzare i dati statistici, deve essere creata una maschera binaria del citofluorogramma con il tasto Mask (Maschera).

& vedi Multicolor / Localizzare coppie di valori del citofluorogramma nell'immagine originale (vedi pagina 278)

Geometric Analysis	**Significato**	**Formula per l'immagine**	**Formula per il ROI**
# Pixels	Numero di pixel nell'immagine o all'interno del campo di analisi (ROI)	$\#P = N_x \cdot N_y$	$\#P = \sum_{\vec{x} \in ROI} 1$

# Pixels, mask	Numero di pixel nei campi mascherato	$\#P_m = \sum_{\bar{x} \in Mask} 1$	$\#P_m = \sum_{\bar{x} \in (Mask \cap ROI)} 1$
Area [µm²]	Superficie del campo di scansione	$A = l_x \cdot l_y$	$A = voxel\ size \cdot \#P$
Area, mask [µm²]	Superficie del campo mascherato	$A_m = A \cdot \frac{\#P_m}{\#P}$	$A_m = A \cdot \frac{\#P_m}{\#P}$
Mask area rate	Quota percentuale dei campi mascherati sull'intera superficie	$\frac{A_m}{A}$	$\frac{A_m}{A}$

Densitometric Analysis	**Significato**	**Formula per l'immagine**	**Formula per il ROI**
Intensity sum	Somma delle intensità	$I_{sum} = \sum_{\bar{x}} I(\bar{x})$ con $\bar{X} \in Image$	$I_{sum} = \sum_{\bar{x}} I(\bar{x})$ con $\bar{X} \in (Image \cap ROI)$
Intensity sum, mask	Somma delle intensità nei campi mascherati	$I_{sum,mask} = \sum_{\bar{x} \in (Image \cap mask)} I(\bar{x})$	$I_{sum,mask} = \sum_{\vec{x} \in (Image \cap mask \cap ROI)} I(\vec{x})$
Mean intensity	Media aritmetica delle intensità	$\bar{I} = \frac{I_{sum}}{\#P}$	$\bar{I} = \frac{I_{sum}}{\#P}$
Mean intensity, mask	Media aritmetica delle intensità nei campi mascherati	$\bar{I}_m = \frac{I_{sum,mask}}{\#P_m}$	$\bar{I}_m = \frac{I_{sum,mask}}{\#P_m}$
Mask intensity rate	Quota percentuale delle intensità nei campi mascherati sul totale delle intensità	$\frac{\bar{I}_m}{\bar{I}}$	$\frac{\bar{I}_m}{\bar{I}}$

Finestra di dialogo Viewer Options, icona Multicolor

In questo capitolo si trovano i seguenti temi:

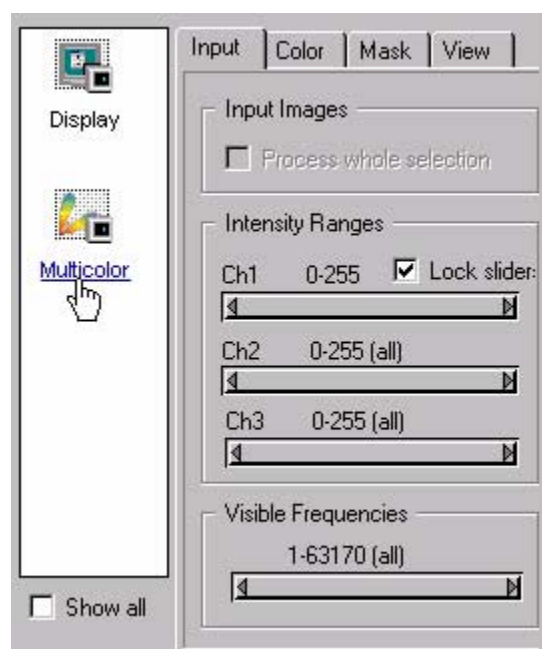
- Struttura della finestra di visualizzazione Experiment Overview
- Opzioni per il campo di valori del citofluorogramma
- Opzioni per le tabelle di classificazione cromatica del citofluorogramma
- Opzioni per la maschera binaria del citofluorogramma
- Opzioni per la visualizzazione del citofluorogramma

Struttura della finestra di visualizzazione Experiment Overview

Per aprire la finestra di dialogo Viewer Options (Opzioni visualizzatore), selezionare l'opzione Experiment Overview (Panoramica esperimento) nel menu View (Visualizzazione). A sinistra dell'interfaccia di comando compare la finestra di visualizzazione Experiment Overview. Nella parte superiore della finestra di visualizzazione, le immagini riprese vengono visualizzate in un albero di directory. Nella parte inferiore si trova la finestra di dialogo Viewer Options. In questa finestra di dialogo si possono effettuare le impostazioni fondamentali per diverse funzioni software. A sinistra vengono visualizzate le icone corrispondenti alle varie funzioni, a destra i relativi registri. Quando si apre la finestra di dialogo, compaiono le icone delle funzioni con le quali si sta correntemente lavorando. Per visualizzare tutte le icone, fare clic sul comando Show all (Mostra tutte).

Nei registri dell'icona Multicolor si possono effettuare le impostazioni opzionali per le seguenti funzioni:

CF2D	& vedi Multicolor / Creare un citofluorogramma bidimensionale (vedi pagina 274)
CF3D	& vedi Multicolor / Creare un citofluorogramma tridimensionale (vedi pagina 277)
Mask	& vedi Multicolor / Localizzare coppie di valori del citofluorogramma nell'immagine originale (vedi pagina 278)
CFOvl	& vedi Multicolor / Visualizzare un'immagine di sovrapposizione (vedi pagina 277)
Stat	& vedi Multicolor / Visualizzare i dati statistici (vedi pagina 280)

Opzioni per il campo di valori del citofluorogramma

Registro Input

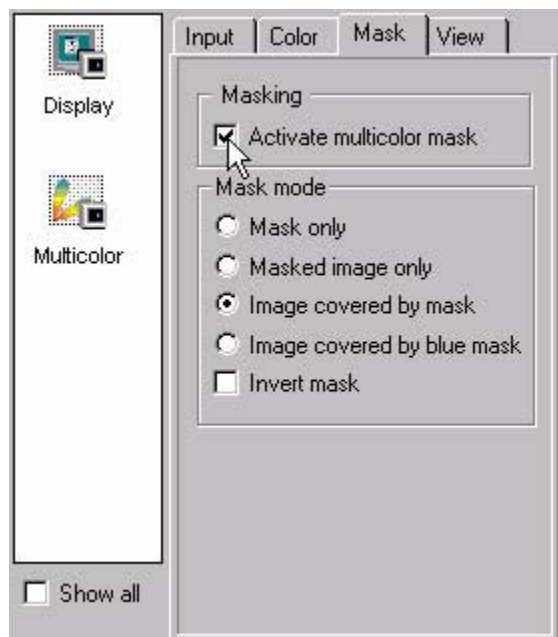
▶	Spostare i cursori nel campo Intensity Ranges (Campi di intensità) per modificare il campo di intensità visualizzato nel citofluorogramma separatamente per ogni canale di rilevamento.
▶	Scegliere la casella di spunta Lock sliders (Blocca cursori) per bloccare tutti cursori dei canali di rilevamento. In questo modo il campo di valori del citofluorogramma può essere modificato contemporaneamente per tutti i canali di rilevamento.
▶	Spostare i cursori nel campo Visible Frequencies (Frequenze visibili) per modificare le coppie di intensità rappresentate nel citofluorogramma in base alla loro frequenza.

Opzioni per le tabelle di classificazione cromatica del citofluorogramma
Per la codificazione cromatica del citofluorogramma si possono selezionare due principali categorie di tabelle di classificazione cromatica. Le tabelle di classificazione cromatica binarie (Binary with ...) visualizzano l'esistenza di una combinazione di intensità. Quando la combinazione di valori compare una sola volta, viene visualizzato un punto nel citofluorogramma. Ogni punto viene rappresentato con la stessa intensità luminosa. Le tabelle di classificazione cromatica codificate per frequenza (Frequency coded ...) visualizzano la frequenza delle coppie di intensità. L'intensità luminosa dei punti

del citofluorogramma è rappresentativa della frequenza: quanto più luminoso è un punto del citofluorogramma, tanto più frequente è la combinazione di intensità che esso rappresenta.

Registro Color

▶	Scegliendo Binary with fixed color (Binaria con colore fisso), tutti i punti del citofluorogramma vengono rappresentati in bianco.
▶	Scegliendo Binary with image colors (Binaria con colori immagine), la nuvola di punti viene codificata con le tabelle di classificazione cromatica dei canali di rilevamento. I punti che si trovano nelle diagonali superficiali o volumetriche, vengono rappresentati in un colore composto delle tabelle di classificazione.
▶	Scegliendo Binary with custom colors (Binaria con colori personalizzati), è possibile sezionare nel campo d'elenco Custom color una serie di tabelle di classificazione cromatica speciali che codificano i punti nelle diagonali superficiali o volumetriche con colori marcati o attenuati.
	Con un citofluorogramma di tre canali di rilevamento, viene automaticamente selezionata la tabella di classificazione cromatica 2x2x2 gray-red.In questo caso, le altre tabelle di classificazione del campo d'elenco non sono più selezionabili.
▶	Scegliendo Frequency coded, linear (Per frequenza, lineare), è possibile selezionare nel campo d'elenco Frequency color LUT una delle tabelle di classificazione cromatica disponibili anche per la codificazione cromatica dei dati immagine nei canali di rilevamento. La codificazione cromatica della frequenza è lineare.
▶	Scegliendo Frequency coded, logarithmic (Per frequenza, logaritmica), è possibile selezionare nel campo d'elenco Frequency color LUT una delle tabelle di classificazione cromatica disponibili anche per la codificazione cromatica dei dati immagine nei canali di rilevamento. La codificazione cromatica della frequenza è logaritmica.
▶	Scegliendo Frequency and Intensity weighted (Frequenza e intensità ponderate), frequenza e intensità vengono contemporaneamente visualizzate con una tabella di classificazione cromatica speciale.
▶	Disattivando la casella di spunta Auto scale (Autodimensionamento), si può immettere un valore per la frequenza massima che venga visualizzato nel citofluorogramma con una tabella di classificazione cromatica per frequenza.

Opzioni per la maschera binaria del citofluorogramma

Registro Mask (Maschera)

▶	Fare clic nella casella di spunta Activate multicolor mask (Attiva maschera multicolor) per creare una maschera binaria del citofluorogramma. Questo equivale all'attivazione del tasto Mask.
▶	Scegliendo Mask only (Solo maschera), nelle immagini originali vengono visualizzati solo i dati immagine mascherati nel citofluorogramma (con un campo di analisi). I dati immagine mascherati vengono rappresentati in bianco.
▶	Scegliendo Masked image only (Solo immagine mascherata), nelle immagini originali vengono visualizzati solo i dati immagine mascherati nel citofluorogramma (con un campo di analisi). La codificazione cromatica dipende dalla tabella di classificazione cromatica del relativo canale di rilevamento.
▶	Scegliendo Image covered by mask (Immagine coperta da maschera), le immagini originali vengono visualizzate insieme ai dati immagine mascherati nel citofluorogramma. I dati immagine mascherati vengono rappresentati in bianco.
▶	Scegliendo Image covered by blue mask (Immagine coperta da maschera blu), le immagini originali vengono visualizzate insieme ai dati immagine mascherati nel citofluorogramma. I dati immagine mascherati vengono rappresentati in blu.
▶	Scegliendo Invert mask (Inverti maschera), si inverte la codificazione cromatica dei dati immagine mascherati e dell'immagine originale.

Opzioni per la visualizzazione del citofluorogramma

Registro View

▶	Facendo clic sulla casella di spunta Show Axes (Mostra assi), vengono visualizzati i due o tre assi spaziali del citofluorogramma.
▶	Facendo clic sulla casella di spunta Show Color LUTs (Mostra tabelle di classificazione cromatica), vengono visualizzate le tabelle di classificazione cromatica dei canali di rilevamento sugli assi del citofluorogramma.
▶	Facendo clic sulla casella di spunta Show Histograms (Mostra istogrammi), viene rappresentata una curva d'istogramma su ogni asse del citofluorogramma bidimensionale.
▶	Facendo clic sulla casella di spunta Show Bounding Box (Mostra scatola di delimitazione), viene visualizzato il cubo del citofluorogramma.
▶	Selezionando l'opzione Fast (Veloce) nel campo Rendering (Traduzione), si può accelerare il calcolo del citofluorogramma con grandi quantità di dati. Si raccomanda questa funzione quando, ad esempio, sia stato cliccato il tasto Gallery (Galleria) e tutti i fotogrammi di una serie di immagini confluiscono nel citofluorogramma.

3D (opzionale)

Questo pacchetto software opzionale non fa parte del pacchetto base del programma. È però possibile ottenerlo presso la propria filiale Leica o presso un rivenditore autorizzato.

Proiezioni tridimensionali e animazioni di serie di immagini

In questo capitolo si trovano i seguenti temi:

- Struttura e controllo della fase operativa Process
- Navigazione: 3D Visualization and Animation\ Projections
- Navigazione: 3D Visualization and Animation\ Projections with Animation
- Navigazione: 3D Visualization and Animation\ Stereo
- Navigazione: 3D Visualization and Animation\ Stereo with Animation

Struttura e controllo della fase operativa Process

Facendo clic sul simbolo di freccia Process (Processo), la normale struttura dell'interfaccia di comando viene completamente modificata. Tutti i tasti di funzione degli altri campi pulsanti/fasi operative si disattivano. Sul lato sinistro viene mostrata la finestra di visualizzazione Experiment Overview (Panoramica esperimento) **(1)** con gli esperimenti aperti. Più in basso si trova la finestra di navigazione **(2)** con l'albero di directory di tutte le funzioni disponibili in questa fase operativa. Al centro dell'interfaccia di comando compaiono 10 grandi zone pagina **(3)** che comprendono 10 moduli. Al di sopra di queste zone pagina si trova un campo di aiuto **(4)**, dove, tenendo il puntatore su una determinata zona pagina, è possibile visualizzare una breve spiegazione del relativo modulo.

▶	Fare clic sulla zona pagina contenente il modulo desiderato. Ad ogni livello di navigazione, puntando il mouse su una specifica zona pagina, si visualizza una spiegazione dei moduli in alto, nel campo di aiuto.
▶	Nei livelli di navigazione successivi, scegliere ogni volta una zona pagina fino a raggiungere la funzione desiderata con la relativa finestra di dialogo all'ultimo livello.
▶	Nella finestra di navigazione si può scegliere direttamente una funzione facendo clic sulla cartella corrispondente.

Nella riga di menu in alto a destra vengono suggeriti i seguenti tasti **(5)**:

▶	Fare clic sul tasto Back (Indietro) per ritornare all'ultimo livello di navigazione visualizzato.
▶	Fare clic sul tasto Forward (Avanti) per visualizzare il livello che si era selezionato prima di aver azionato con un clic il tasto Back.

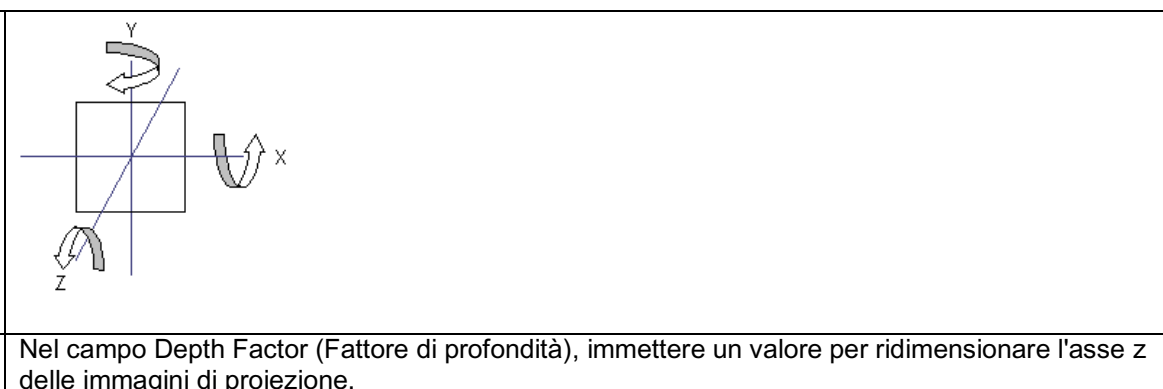
▶	Fare clic sul tasto Up (Su) per portarsi al livello gerarchicamente superiore.
▶	Fare clic sul tasto Reset (Ripristina) per riportare le variabili modificate all'ultima impostazione.
▶	Per uscire dalla fase operativa Process (Processo), fare clic sul simbolo di freccia di un'altra fase operativa (per esempio, Acquire).

Nell'estremità inferiore di ogni finestra di dialogo si trovano questi due pulsanti:

Preview Apply

▶	Fare clic sul pulsante Preview (Anteprima) per eseguire la funzione selezionata e visualizzare l'immagine finale a destra, nella finestra di anteprima.
▶	Fare clic sul tasto Apply (Applica) per applicare la funzione selezionata al record di dati immagine attivo, visualizzare l'immagine finale nella finestra di visualizzazione Viewer e creare un nuovo file nell'esperimento attivo.

Navigazione: 3D Visualization and Animation\ Projections
Creare immagini di proiezione lungo un asse di proiezione liberamente regolabile

& vedi Principio e tipi di proiezioni (pagina 206)

▶	Nella finestra di visualizzazione Experiment Overview (Panoramica esperimento), selezionare il record di dati immagine da elaborare facendo doppio clic sul file.
▶	Selezionare uno dei quattro tipi di proiezione: proiezione media (Average Projection), proiezione massima (Maximum Projection), proiezione trasparente (Transparent Projection), proiezione SFP (SFP Projection, SFP Shadow Projection).

Registro Options (Opzioni)

▶	Fare clic su Rescale (Ridimensiona) nel campo Options per normalizzare i valori di intensità dell'immagine alle intensità massime possibili durante la creazione dell'immagine di proiezione. Questo assicura che i grigi dell'immagine di proiezione rilevati rimangano all'interno del campo di valori compreso, per esempio, tra 0 e 255 con 8 bit. Le immagini scure possono così essere schiarite.
▶	Se si fa clic su Invert (Inverti) nel registro Options, l'asse di proiezione viene riflesso. Il calcolo dell'immagine di proiezione avviene quindi nella direzione opposta. Questa funzione è utile, soprattutto con microscopi inversi, per adattare il calcolo dell'immagine di proiezione al cammino ottico inverso della luce laser.
▶	Muovere il cursore nel campo Threshold (Soglia) per definire un valore di soglia. Per la creazione dell'immagine di proiezione, i valori di intensità al di sotto di questo valore non vengono considerati.

Registro Rotation (Rotazione)

▶	Nel campo Viewing Direction (Visualizza direzione), impostare l'asse di proiezione desiderato immettendo un valore per Z, Y e X. Con questi tre valori, si ruota la pila di immagini in una determinata posizione definendo così l'angolo entro il quale avviene la proiezione della pila stessa.
	L'asse di proiezione è la direzione visiva dell'osservatore sulla pila di immagini ruotata. Lo schema riportato di seguito indica il senso di rotazione del livello immagine specifico, con valori positivi di Z, Y e X. Per valori negativi, il senso di rotazione è esattamente quello inverso.

▶	Nel campo Depth Factor (Fattore di profondità), immettere un valore per ridimensionare l'asse z delle immagini di proiezione.

Registro Factor (solo per proiezioni trasparenti)

& vedi Principio e tipi di proiezioni (pagina 206)

▶	Il registro Factor (Fattore) viene mostrato solo se è stata selezionata la proiezione trasparente. Con il cursore si modifica il fattore di trasparenza. Maggiore è il fattore impostato, maggiore è il flusso delle intensità dal livello inferiore della pila di immagini nell'immagine di proiezione.
▶	Fare clic sulla zona pagina Transparency Gallery (galleria trasparenza) per vedere una galleria di immagini di anteprima del record di dati immagine selezionato. Ogni immagine di anteprima è stata calcolata con un fattore di trasparenza diverso. Fare clic su una zona pagina per visualizzare la finestra di dialogo con le relative impostazioni.

Registro Light (solo per la proiezione SFP)

& vedi Principio e tipi di proiezioni (pagina 206)

▶	Il registro Light (Luce) viene mostrato solo se è stata selezionata la proiezione SFP. Nel campo Light Direction (direzione della luce), definire l'angolo di proiezione per il primo intervallo di calcolo della proiezione SFP. Questa angolo rappresenta l'angolo di incidenza del raggio laser sul preparato. Immettere ogni volta una coordinata per x e y.
▶	Muovere il cursore nel campo Absorption (Assorbimento) per modificare il coefficiente di assorbimento. Maggiore è l'impostazione, minori sono i valori calcolati nell'immagine di proiezione. Impostando il coefficiente ad un valore basso, molti pixel nell'immagine di proiezione raggiungono il valore massimo, pertanto le strutture sono sempre più difficilmente distinguibili.
▶	Facendo clic nel registro Options nel campo Options su Calc. Shadow (Calc. ombre), viene calcolata e visualizzata un'ombra d'urto per l'immagine a proiezione SFP.
▶	Fare clic sulla zona pagina SFP Light Gallery per vedere una galleria di immagini di anteprima del record di dati immagine selezionato. Ogni immagine di anteprima è stata calcolata con un angolo di proiezione diverso. Fare clic su una zona pagina per visualizzare la finestra di dialogo con le relative impostazioni.
▶	Fare clic sulla zona pagina SFP Absorption Gallery (galleria assorbimento SFP) per vedere una galleria di immagini di anteprima del record di dati immagine selezionato. Ogni immagine di anteprima è stata calcolata con un coefficiente di assorbimento diverso. Fare clic su una zona pagina per visualizzare la finestra di dialogo con le relative impostazioni.

Navigazione: 3D Visualization and Animation\ Projections and Animation
Far scorrere immagini di proiezione come un'animazione rotatoria tridimensionale

& vedi Principio e tipi di proiezioni (pagina 206)

Registro Animation

▶	Per impostare l'animazione rotatoria, fare clic sulla casella di spunta Animation. Si attivano i relativi campi.
▶	Nel campo Rotation (Rotazione), selezionare il tipo di animazione: giro completo o 360° (full

	turn), metà giro o 180° (half turn), un quarto di giro o 90° (quarter turn), oppure un altro angolo a scelta.
▶	Nel campo Frames (Fotogrammi), immettere il numero di immagini di proiezione da creare per l'animazione. Il numero di immagini di proiezione e il tipo di animazione determinano gli intervalli per la creazione delle immagini di proiezione. Con un mezzo giro (angolo di 180°) e un numero di immagini, per esempio, pari a 10, l'immagine viene creata ad intervalli di 20° ognuno (non 18°), in quanto per 10 riprese ci sono solo 9 intervalli.
	Con il giro completo (angolo di 360°) si effettua un altro calcolo. Per evitare che la prima e l'ultima immagine di proiezione vengano riprese tra lo stesso angolo (360° = 0°), la funzione calcola di più con una ripresa, senza però creare l'immagine di proiezione equivalente. Con un numero di immagini pari a 10, ad esempio, l'intervallo tra le immagini di proiezione equivale a 36° (non 40°), in quanto vengono considerate 11 riprese (quindi 10 intervalli). Si creano però soltanto 10 immagini di proiezione.
▶	Nel campo Rotation Axis (Asse di rotazione), modificare l'inclinazione dell'asse di rotazione.
▶	Per avviare l'animazione rotatoria, fare clic sul tasto Movie (Film). & vedi Avviare e terminare una pellicola (pagina 204)

I tre tipi di proiezione possono essere anche attivati direttamente tramite il relativi tasti (3D Proj / 3D Max / 3D Avg / 3D Trans). Se la funzione viene attivata tramite il tasto, l'immagine di proiezione è solo una visualizzazione temporanea su monitor. Questa può essere annullata con il tasto Original (originale).

& vedi Proiezione massima di una pila di immagini con un asse di proiezione variabile (pagina 210)
& vedi Proiezione media di una pila di immagini con un asse di proiezione variabile (pagina 297)
& vedi Proiezione trasparente di una pila di immagini con un asse di proiezione variabile (pagina 212)

Navigazione: 3D Visualization and Animation\ Stereo
Navigazione: 3D Visualization and Animation\ Stereo with Animation
Creare immagini stereoscopiche rosso-verdi (immagini anaglifiche)

Campo Stereo View Options

▶	Nel campo d'elenco Eye Angle (Angolo visivo), specificare l'angolo entro il quale vengono riprese le due immagini stereoscopiche. Per esempio, immettendo il valore 30, l'immagine stereoscopica viene ripresa ogni volta ad un angolo di 15° a destra e a sinistra dell'asse di proiezione impostato nel registro Rotation (Rotazione).
▶	Le immagini stereoscopiche possono essere create soltanto da un canale di rilevamento. Se si ha una serie di immagini riprese in più canali di rilevamento, selezionare il record di dati immagine desiderato nel campo d'elenco Detection Channel (Canale di rilevamento).
▶	Per visualizzare le due immagini stereoscopiche in un'immagine all'interno della finestra di visualizzazione Viewer, si devono premere i tasti Channel 1, Channel 2, Single e Overlay (canale 1/canale 2/ singola e sovrapposizione). & vedi Visualizzare il canale di rilevamento 1 (pagina 196) & vedi Visualizzare il canale di rilevamento 2 (pagina **Error! Bookmark not defined.**) & vedi Visualizzare un fotogramma (pagina 199)

	& vedi Visualizzare un'immagine di sovrapposizione (pagina 200)

Integrazione
Se le si osserva con degli appositi occhiali tridimensionali (occhiali stereoscopici rosso-verdi), le immagini anaglifiche creano un'impressione di profondità spaziale. L'effetto spaziale dell'immagine anaglifica è legato al fatto che l'uomo vede con due occhi. Attraverso la distanza interpupillare, pari a circa 6,5 cm, il cervello riceve due immagini da due prospettive diverse. Oggetti a distanze diverse vengono percepiti da angolo diversi. Per il cervello dell'uomo, questa differenza d'angolazione è una misura per la distanza. La differenza di immagini simili create dai due occhi viene elaborata dal cervello e diventa un'unica immagine con impressione di profondità spaziale. Queste differenze d'immagine possono essere ricreate anche tenendo davanti ad ogni occhio un'immagine leggermente diversa.

Con le immagini anaglifiche, tutte le informazioni relative alle immagini stereoscopiche si trovano su un'unica immagine. Le informazioni dell'immagine sinistra e destra sono codificate attraverso i colori. Ecco perché, per osservare le immagini, servono occhiali dotati di un diverso filtro selettivo che separi le informazioni grafiche per ogni occhio. Il filtro rosso fa passare liberamente soltanto la luce rossa, mentre la luce verde viene completamente assorbita. Viceversa, il filtro verde assorbe la luce rossa. Ogni occhio riconosce un'immagine che entrambi fondono nel cervello, creando un'unica immagine spaziale.

Filtri lineari e filtri morfologici

In questo capitolo si trovano i seguenti temi:

- Struttura e controllo della fase operativa Process
- Cosa sono i filtri lineari?
- Navigazione: Image Filters\ Linear Filters
- Cosa sono i filtri morfologici?
- Navigazione: Image Filters\ Morphological Filters

Struttura e controllo della fase operativa Process

Facendo clic sul simbolo di freccia Process (Processo), la normale struttura dell'interfaccia di comando viene completamente modificata. Tutti i tasti di funzione degli altri campi pulsanti/fasi operative si disattivano. Sul lato sinistro viene mostrata la finestra di visualizzazione Experiment Overview (Panoramica esperimento) **(1)** con gli esperimenti aperti. Più in basso si trova la finestra di

navigazione **(2)** con l'albero di directory di tutte le funzioni disponibili in questa fase operativa. Al centro dell'interfaccia di comando compaiono 10 grandi zone pagina **(3)** che comprendono 10 moduli. Al di sopra di queste zone pagina si trova un campo di aiuto **(4)**, dove, tenendo il puntatore su una determinata zona pagina, è possibile visualizzare una breve spiegazione del relativo modulo.

- ▶ Fare clic sulla zona pagina contenente il modulo desiderato. Ad ogni livello di navigazione, puntando il mouse su una specifica zona pagina, si visualizza una spiegazione dei moduli in alto, nel campo di aiuto.
- ▶ Nei livelli di navigazione successivi, scegliere ogni volta una zona pagina fino a raggiungere la funzione desiderata con la relativa finestra di dialogo all'ultimo livello.
- ▶ Nella finestra di navigazione si può scegliere direttamente una funzione facendo clic sulla cartella corrispondente.

Nella riga di menu in alto a destra vengono suggeriti i seguenti tasti **(5)**:

- ▶ Fare clic sul tasto Back (Indietro) per ritornare all'ultimo livello di navigazione visualizzato.
- ▶ Fare clic sul tasto Forward (Avanti) per visualizzare il livello che si era selezionato prima di aver azionato con un clic il tasto Back.
- ▶ Fare clic sul tasto Up (Su) per portarsi al livello gerarchicamente superiore.
- ▶ Fare clic sul tasto Reset (Ripristina) per riportare le variabili modificate all'ultima impostazione.
- ▶ Per uscire dalla fase operativa Process (Processo), fare clic sul simbolo di freccia di un'altra fase operativa (per esempio, Acquire).

Nell'estremità inferiore di ogni finestra di dialogo si trovano questi due pulsanti:

- ▶ Fare clic sul pulsante Preview (Anteprima) per eseguire la funzione selezionata e visualizzare l'immagine finale a destra, nella finestra di anteprima.
- ▶ Fare clic sul tasto Apply (Applica) per applicare la funzione selezionata al record di dati immagine attivo, visualizzare l'immagine finale nella finestra di visualizzazione Viewer e creare un nuovo file nell'esperimento attivo.

Cosa sono i filtri lineari?
I filtri vengono utilizzati per migliorare la qualità di un'immagine. Di norma ciò significa rimuovere dall'immagine i punti grafici indesiderati (pixel). Con la funzione filtrante qui disponibile, quella di un filtro passa basso, nell'immagine viene soppresso il disturbo statistico che, ad esempio, può essere provocato dal rivelatore.

Il principio di un filtro è quello di compensare il valore di un pixel in un'immagine con i valori dei suoi pixel adiacenti. Il nucleo filtrante (Kernel) descrive il numero e la ponderazione dei pixel adiacenti che confluiscono nel calcolo del nuovo punto. Il nucleo filtrante qui utilizzato può essere descritto con il triangolo di Pascal:

Grandezza del nucleo filtrante	Triangolo di Pascal	Normalizzazione
	1 1	1/2
Kernel Size 3	1 2 1	1/4
	1 3 3 1	1/8
Kernel Size 5	1 4 6 4 1	1/16
	1 5 10 10 5 1	1/32
Kernel Size 7	1 6 15 20 15 6 1	1/64

Kernel Size 9 ...	1 7 21 35 35 21 7 1 1 8 28 56 70 56 28 8 1 ...	1/128 1/256 ...

Per esempio, selezionando un nucleo filtrante di grandezza 5 (Kernel Size 5), si usano ogni volta 5 pixel dell'immagine originale nel calcolo di 1 pixel dell'immagine filtrata. Il punto da calcolare è sempre il pixel centrale nel nucleo filtrante. I grigi dei 5 pixel, in base allo schema di ponderazione 1-4-6-4-1, vengono moltiplicati per i fattori 1/16, 4/16, 6/16, 4/16, 1/16, e sommati tra di loro fino ad ottenere il valore finale. Nella seguente rappresentazione schematica, questo implica che per il calcolo del pixel C i grigi dei pixel A, B e D, E confluiscono nel calcolo del pixel C' filtrato. 16x1/16 + 4x4/16 + 8x6/16 + 32x4/16 + 8x1/16 = 1 + 1 + 3 + 8 + 0,5 = 13,5.

	A	B	C	D	E
Grigi dei pixel A-E nell'immagine originale	16	4	8	32	8
Fattori della grandezza del nucleo filtrante 5	1/16	4/16	6/16	4/16	1/16
Grigio di C' nell'immagine filtrata			13,5		

Lo stesso calcolo viene eseguito per ogni pixel dell'immagine originale. Sul bordo dell'immagine si erge la maschera filtrante sull'immagine stessa. Per questi pixel viene impostato il valore 0.

Azione dei filtri lineari

Profilo di intensità di un'immagine non filtrata

Profilo di intensità dell'immagine dopo l'applicazione del filtro Blur

Profilo di intensità dell'immagine dopo l'applicazione del filtro Sharpen

Profilo di intensità dell'immagine dopo l'applicazione del filtro Highpass

▶	Selezionando il filtro Blur (Sfocatura), all'immagine viene applicato il filtro passa-basso descritto in precedenza. Questo tipo di filtro filtra le alte frequenze dall'immagine: ciò significa che le transizioni molto accentuate da intensità basse ad intensità elevate vengono attenuate. Con questo filtro, si possono togliere i disturbi da un'immagine.
▶	Selezionando il filtro Sharpen (Aumento definizione), all'immagine viene applicato il filtro passa-basso, quindi i valori dell'immagine filtrata in passa-alto vengono sommati ai valori dell'immagine originale. Questo tipo di filtro filtra le basse frequenze dall'immagine: ciò significa che le transizioni molto accentuate da intensità basse ad intensità elevate vengono amplificate.
▶	Selezionando il filtro passa-alto, all'immagine viene applicato il filtro passa-basso, quindi i valori dell'immagine originale vengono sottratti dai valori dell'immagine filtrata in passa-basso. Il risultato corrisponde ad un'immagine elaborata con un filtro passa-alto. Questo tipo di filtro rappresenta nell'immagine solo le transizioni molto accentuate da intensità basse ad intensità elevate.

Navigazione: Image Filters\ Linear Filters
Applicare filtri lineari (filtri passa-alto e passa-basso) ad immagini

▶	Nella finestra di visualizzazione Experiment Overview (Panoramica esperimento), selezionare il record di dati immagine da elaborare facendo doppio clic sul file.
▶	Selezionare uno dei tre tipi di filtro: Livellamento (Blur), Incremento definizione (Sharpen), Filtro

	passa-alto (Highpass).
▶	Nel campo Kernel Size (Grandezza del nucleo), selezionare un valore di grandezza del nucleo filtrante. Il valore, che viene indicato nel campo Kernel Size come Cut-off Wavelength (Lunghezza d'onda limite), è la grandezza del filtro misurata in pixel. Questo valore viene calcolato in base ai parametri di scansione utilizzati per l'immagine specifica (ingrandimento dell'obiettivo, lunghezza d'onda della luce di eccitazione, formato di scansione, fattore di zoomata elettronico ...).
▶	Nel campo Filter Directions (Direzioni del filtro), impostare la dimensionalità del filtro. Selezionare gli assi spaziali a cui applicare il filtro in modo sequenziale. in questo caso vengono utilizzati filtri unidimensionali, ossia il filtro viene calcolato sempre solo su un asse alla volta. Il valore, che viene indicato nel campo Filter Directions come Cut-off Wavelength, è la grandezza del filtro misurata in nanometri. Con un valore di 160 nm, per esempio, vengono filtrate tutte le lunghezze d'onda inferiori o uguali a 160 nm.

Sharp Factor (solo per il tipo di filtro Sharpen)

▶	Nel campo Sharp Factor, modificare con il cursore l'azione del tipo di filtro Sharp. Se questo fattore è impostato a 0, il filtro non è attivo.

Zone pagina Blur (Gallery), Sharpen (Gallery), Highpass (Gallery)

▶	Fare clic sulla zona pagina Blur (Gallery), Sharpen (Gallery) o Highpass (Gallery), per vedere una galleria di immagini di anteprima del record di dati immagine selezionato. Ogni immagine di anteprima è stata calcolata con una grandezza del nucleo filtrante diversa (e un fattore di definizione diverso). Fare clic su una zona pagina per visualizzare la finestra di dialogo con le relative impostazioni.

Cosa sono i filtri morfologici?
I filtri morfologici servono a modificare, mediante operatori matematici, la forma di strutture continue dell'immagine e a dividerle dallo sfondo. Gli operatori morfologici vengono normalmente applicati ad immagini binarie. Le immagini binarie sono caratterizzate da pixel aventi solo il valore 1 o 0. Nel Leica Confocal Software, le immagini binarie possono essere create con le funzioni di segmentazione. Questi operatori consentono anche di creare immagini di grigi, ossia immagini aventi un campo di valori, per esempio, di 256 (8 bit) diversi grigi/ valori di intensità.

& vedi Fase operativa Process / cartella Segmentation (pagina 299)

Il principio è quello di muovere una maschera, definita anche elemento strutturale, pixel per pixel sopra l'immagine. Il pixel da analizzare è sempre il pixel centrale della maschera. Nel Leica Confocal Software, la maschera può avere la forma di un quadrato, di una croce o di un cerchio. La forma e la grandezza della maschera determinano quali e quanti pixel adiacenti debbano essere coinvolti per la filtrazione. In base ad
un determinato criterio, si stabilisce quali pixel vengano definiti nell'immagine finale come struttura, e quali come sfondo. Per immagini binarie, questo criterio è rappresentato dalla connessione logica AND e OR, per immagini di grigi dal livello del grigio/ valore di intensità.

& vedi Operazioni booleane (pagina 306)

Con la forma della maschera si influenzano le strutture evidenziate nell'immagine finale. Se la forma della maschera è quella di una sfera, ad esempio, nell'immagine finale vengono marcate le forme rotonde. Tuttavia, il rapporto di vicinanza con cui il pixel specifico dell'immagine finale viene codificato come struttura o come sfondo è legato all'operatore morfologico.

Esistono questi due tipi fondamentali di operatori morfologici, cioè l'erosione (Erosion) e la dilatazione (Dilation), come pure combinazioni di questi operatori:

Operatore	Descrizione
Erosione (Erosion)	Con immagini binarie, il pixel analizzato nell'immagine finale viene impostato al valore binario 1 quando tutti i pixel adiacenti (in base alla forma e alla grandezza della maschera) nell'immagine binaria originale sono codificati con un 1.

	Con immagini di grigi, invece del valore del pixel analizzato nell'immagine finale, viene registrato il livello di grigio minimo dei pixel adiacenti.
Dilatazione (Dilation)	Con immagini binarie, il pixel analizzato nell'immagine finale viene impostato al valore binario 1, quando almeno uno dei pixel adiacenti (in base alla forma e alla grandezza della maschera) nell'immagine binaria di soglia è codificato con un 1. Con immagini di grigi, invece del valore del pixel analizzato nell'immagine finale, viene registrato il valore di intensità massimo dei pixel adiacenti.

Combinazione di operatori	Descrizione
Apri (Open)	Apri è una combinazione di operatori. Prima viene eseguita una erosione, poi una dilatazione.
Chiudi (Close)	Chiudi è una combinazione di operatori. Prima viene eseguita una dilatazione, poi una erosione.
Top Hat	Top Hat elabora l'immagine con la combinazione di operatori Apri ed estrae l'immagine finale dall'immagine originale.
Bottom Hat	Bottom Hat elabora l'immagine con la combinazione di operatori Chiudi ed estrae l'immagine originale dall'immagine finale.

Filtro	Descrizione
Median	Il filtro Median appartiene al gruppo di filtri gerarchici non lineari. Con la filtrazione della mediana, i valori di intensità dei pixel adiacenti (in base alla forma e alla grandezza della maschera) vengono ordinati per grandezza. Nell'immagine finale della filtrazione di mediana, invece del pixel analizzato, viene poi registrato il valore di intensità che si trova al centro di questa gerarchia.

Azione degli operatori morfologici

Immagine originale	**Dopo l'applicazione del filtro Median**
Le strutture (con valori di intensità molto elevati) sono rappresentate cromaticamente in grigio, lo sfondo (valore di intensità 0) in blu scuro. Tra questi due valori estremi, l'intervallo tra intensità elevate e intensità basse è codificato in marrone, giallo, verde e turchese.	Il filtro Median sfoca l'intera immagine, accentuando e contornando al contempo le strutture presenti nella stessa.
Dopo l'applicazione dell'operatore Erosion (erosione)	**Dopo l'applicazione dell'operatore Dilation (dilatazione)**
Le strutture continue si restringono, le strutture minori e i collegamenti tra le strutture scompaiono (si abbassa il numero delle intensità elevate, mentre aumenta il numero delle intensità basse).	Si ingrandiscono le strutture continue e gli spazi intermedi all'interno di una struttura e tra le strutture vengono riempiti (aumenta il numero di intensità elevate, si abbassa

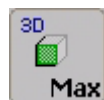
	quello delle intensità basse).
Dopo l'applicazione dell'operatore Open (Erosione + Dilatazione)	**Dopo l'applicazione dell'operatore Close (Dilatazione + Erosione)**
Le strutture continue si restringono e gli spazi intermedi diventano più grandi (si abbassa il numero di intensità elevate, mentre aumenta il numero delle intensità basse).	Si ingrandiscono le strutture continue e gli spazi intermedi rimangono quasi invariati (aumenta il numero di intensità elevate, mentre il numero delle intensità basse rimane all'incirca lo stesso).
Dopo l'applicazione dell'operatore Top Hat	**Dopo l'applicazione dell'operatore Bottom Hat**
Vengono estratte le intensità elevate	Vengono estratte le intensità basse

Navigazione: Image Filters\ Morphological Filters
Applicare filtri morfologici ad immagini

▶	Nella finestra di visualizzazione Experiment Overview (panoramica esperimento), selezionare il record di dati immagine da elaborare facendo doppio clic sul file.
▶	Selezionare uno dei sette tipi di filtro: filtro di mediana (Median), erosione (Erosion), dilatazione (Dilation), Apri (Open), Chiudi (Close), Top hat e Bottom hat.
▶	Selezionare nel campo Mask (Maschera) la forma base della maschera filtro: quadrato (Cube), crocetta (Cross) o cerchio (Sphere). Con la selezione della forma dell'elemento strutturale, si influenzano le strutture dell'immagine ricavate dal filtro. I cerchi, per esempio, marcano le strutture rotonde dell'immagine finale.
▶	Nei campi Size X, Size Y e Size Z, indicare la grandezza della maschera in pixel. La grandezza della maschera determina quanti pixel adiacenti vengono inclusi nella maschera filtrante.
▶	Nel campo Repetition (ripetizione), stabilire la frequenza di applicazione del filtro.

Zone pagina con l'identificazione (Gallery)

▶	Fare clic su una della zone pagina contrassegnate con (Gallery/galleria) per vedere una galleria di immagini di anteprima del record di dati immagine selezionato. Ogni immagine di anteprima è stata calcolata con un elemento strutturale e/o una grandezza di maschera diversi. Fare clic su una zona pagina per visualizzare la finestra di dialogo con le relative impostazioni.

Proiezione massima di una pila di immagini con un asse di proiezione variabile

Funzione
Con il tasto 3D Max. si inizia una proiezione massima. L'asse di proiezione può essere modificato liberamente.
Condizione di base per l'applicazione di una proiezione è una pila di immagini, quindi una serie di sezioni orizzontali xy o sezioni verticali xz. Durante la creazione di una proiezione, i punti di scansione dei fotogrammi, che sono sovrapposti lungo l'asse di proiezione, vengono analizzati attraverso tutte le sezioni ottiche. Per ognuna di queste colonne di punti di scansione viene poi rappresentato nell'immagine di proiezione bidimensionale il valore di intensità massimo come riferimento per tutte le intensità all'interno della colonna.

& vedi Principio e tipi di proiezioni (pagina 206)

▶	Facendo clic sul tasto 3D Max, si crea una proiezione massima dell'attuale pila di immagini che poi viene rappresentata nella finestra di visualizzazione Viewer.
▶	L'asse di proiezione può essere ora modificato facendo clic nell'immagine all'interno della finestra di visualizzazione Viewer e tenendo premuto il tasto sinistro del mouse.
▶	Compaiono delle linee ausiliarie tratteggiate che circoscrivono la pila di immagini rappresentata simbolicamente. Quindi, ruotare la pila di immagini nella nuova posizione che si desidera spostando il puntatore con il tasto sinistro del mouse premuto.
▶	Quando poi si rilascia il tasto sinistro del mouse, viene calcolata e visualizzata la nuova proiezione massima. L'asse di proiezione è la direzione visiva dell'utente sulla pila di immagini riposizionata.
▶	Con il tasto Zoom è possibile ingrandire o rimpicciolire la proiezione. & vedi Zoomare un'immagine tridimensionale (pagina 215)
▶	In qualsiasi momento si può tornare all'immagine originale facendo clic sul tasto Original (originale).

Nella finestra di dialogo Viewer Options (Opzioni visualizzatore) si può inoltre impostare un valore di soglia (threshold) e ridimensionare il campo di valori di intensità presenti nell'immagine (scaling).

& vedi Finestra di dialogo Viewer Options, icona Projections (pagina 189)

Una proiezione massima può essere attivata, da un lato, con il tasto 3D Max., dall'altro, nella fase operativa Process / cartella 3D Visualization and Animation (visualizzazione ed animazione tridimensionale). Se la funzione viene attivata tramite il tasto, l'immagine di proiezione è solo una visualizzazione temporanea su monitor.

& vedi Fase operativa Process / cartella 3 D Visualization and Animation (pagina 286)
& vedi Creare un esperimento (pagina 257)

Si tenga presente la differenza che esiste tra una proiezione massima e un'immagine topografica creata da picchi di intensità. In una proiezione massima, tutti i picchi di intensità vengono direttamente assegnati ad un valore cromatico. In un'immagine topografica di picchi di intensità, questi ultimi vengono prima attribuiti alla posizione z reale del punto di scansione interessato e poi codificati cromaticamente.

& vedi Creare un'immagine topografica (pagina 212)

Proiezione media di una pila di immagini con un asse di proiezione variabile

Funzione

Con il tasto 3D Avg. (Media 3D) si inizia una proiezione media. L'asse di proiezione può essere modificato liberamente.
Condizione di base per l'applicazione di una proiezione è una pila di immagini, quindi una serie di sezioni orizzontali xy o sezioni verticali xz. Durante la creazione di una proiezione, i punti di scansione dei fotogrammi, che sono sovrapposti lungo l'asse di proiezione, vengono analizzati attraverso tutte le sezioni ottiche. Per ognuna di queste colonne di punti di scansione, viene calcolata la media aritmetica di tutti i valori di intensità che poi viene rappresentata nell'immagine di proiezione bidimensionale come riferimento per l'intera colonna.

& vedi Principio e tipi di proiezioni (pagina 206)

▶	Facendo clic sul tasto 3D Avg., si crea una proiezione media dell'attuale pila di immagini che poi viene rappresentata nella finestra di visualizzazione Viewer.
▶	L'asse di proiezione può essere ora modificato facendo clic nell'immagine all'interno della finestra di visualizzazione Viewer e tenendo premuto il tasto sinistro del mouse.
▶	Compaiono delle linee ausiliarie tratteggiate che circoscrivono la pila di immagini rappresentata simbolicamente. Quindi, ruotare la pila di immagini nella nuova posizione che si desidera spostando il puntatore con il tasto sinistro del mouse premuto.
▶	Quando poi si rilascia il tasto sinistro del mouse, viene calcolata e visualizzata la nuova proiezione media. L'asse di proiezione è la direzione visiva dell'utente sulla pila di immagini riposizionata.
▶	Con il tasto Zoom è possibile ingrandire o rimpicciolire la proiezione. & vedi Zoomare un'immagine tridimensionale (pagina 215)
▶	In qualsiasi momento si può tornare all'immagine originale facendo clic sul tasto Original (originale).

Nella finestra di dialogo Viewer Options (opzioni visualizzatore) si può inoltre impostare un valore di soglia (threshold) e ridimensionare il campo di valori di intensità presenti nell'immagine (scaling).

& vedi Finestra di dialogo Viewer Options, icona Projections (pagina 189)

Una proiezione media può essere attivata, da un lato, con il tasto 3D Avg., dall'altro, nella fase operativa Process / cartella 3D Visualization and Animation (Visualizzazione ed animazione tridimensionale). Se la funzione viene attivata tramite il tasto, l'immagine di proiezione è solo una visualizzazione temporanea su monitor.

& vedi Fase operativa Process / cartella 3 D Visualization and Animation (pagina 286)
& vedi Creare un esperimento (pagina 257)

Proiezione trasparente di una pila di immagini con un asse di proiezione variabile

Funzione

Con il tasto 3D Trans. (Trasl. 3D) si inizia una proiezione trasparente. L'asse di proiezione può essere modificato liberamente.
Condizione di base per l'applicazione di una proiezione è una pila di immagini, quindi una serie di sezioni orizzontali xy o sezioni verticali xz. Durante la creazione di una proiezione, i punti di scansione dei fotogrammi, che sono sovrapposti lungo l'asse di proiezione, vengono analizzati attraverso tutte le sezioni ottiche. Per ognuna di queste colonne di punti di scansione si calcola poi una media ponderata di tutti i valori di intensità, e questa viene rappresentata nell'immagine di proiezione bidimensionale come riferimento per l'intera colonna.

& vedi Principio e tipi di proiezioni (pagina 206)

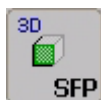
L'utente può modificare la ponderazione dei punti di scansione per il calcolo della media impostando un fattore appropriato (transparent factor) nella finestra di dialogo Viewer Options (opzioni visualizzatore). Inoltre, è possibile impostare anche un valore di soglia (threshold) e ridimensionare il campo di intensità presente nell'immagine (scaling).

& vedi Finestra di dialogo Viewer Options, icona Projections (pagina 189)

▶	Facendo clic sul tasto 3D Trans, si crea una proiezione trasparente dell'attuale pila di immagini, che poi viene rappresentata nella finestra di visualizzazione Viewer.
▶	L'asse di proiezione può essere ora modificato facendo clic nell'immagine all'interno della finestra di visualizzazione Viewer e tenendo premuto il tasto sinistro del mouse.
▶	Compaiono delle linee ausiliarie tratteggiate che circoscrivono la pila di immagini rappresentata simbolicamente. Quindi, ruotare la pila di immagini nella nuova posizione che si desidera spostando il puntatore con il tasto sinistro del mouse premuto.
▶	Quando poi si rilascia il tasto sinistro del mouse, viene calcolata e visualizzata la nuova proiezione trasparente. L'asse di proiezione è la direzione visiva dell'utente sulla pila di immagini riposizionata.
▶	Con il tasto Zoom è possibile ingrandire o rimpicciolire la proiezione. & vedi Zoomare un'immagine tridimensionale (pagina 215)
▶	In qualsiasi momento si può tornare all'immagine originale facendo clic sul tasto Original (Originale).

Una proiezione trasparente può essere attivata, da un lato, con il tasto 3D Trans., dall'altro, nella fase operativa Process / cartella 3D Visualization and Animation (visualizzazione ed animazione tridimensionale). Se la funzione viene attivata tramite il tasto, l'immagine di proiezione è solo una visualizzazione temporanea su monitor.

& vedi Fase operativa Process / pulsante 3D Visualization and Animation (pagina 286)
& vedi Creare un esperimento (pagina 257)

Creare una proiezione SFP di una pila di immagini

Funzione

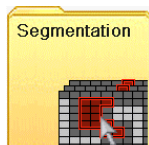
Con il tasto SFP si inizia una proiezione SFP, la simulazione matematica di una processo di fluorescenza. Condizione di base per l'applicazione di una proiezione è una pila di immagini, quindi una serie di sezioni orizzontali xy o sezioni verticali xz. Durante la creazione di una proiezione, i punti di scansione dei fotogrammi, che sono sovrapposti lungo l'asse di proiezione, vengono analizzati attraverso tutte le sezioni ottiche. Nella prima fase, viene simulato il raggio laser che penetra attraverso il campione e si affievolisce. Nella seconda fase, facendo riferimento alle intensità luminose rilevate, viene calcolata la fluorescenza simulata per ogni voxel.

& vedi Principio e tipi di proiezioni (pagina 206)

▶	Facendo clic sul tasto SFP, si crea una proiezione SFP dell'attuale pila di immagini, che viene poi rappresentata nella finestra di visualizzazione Viewer.
▶	L'asse di proiezione può essere ora modificato facendo clic nell'immagine all'interno della finestra di visualizzazione Viewer e tenendo premuto il tasto sinistro del mouse.
▶	Compaiono delle linee ausiliarie tratteggiate che circoscrivono la pila di immagini rappresentata simbolicamente. Quindi, ruotare la pila di immagini nella nuova posizione che si desidera spostando il puntatore con il tasto sinistro del mouse premuto.
▶	Quando poi si rilascia il tasto sinistro del mouse, viene calcolata e visualizzata la nuova proiezione SFP. L'asse di proiezione è la direzione visiva dell'utente sulla pila di immagini riposizionata.
▶	In qualsiasi momento si può tornare all'immagine originale facendo clic sul tasto Original (Originale).

La proiezione SFP può essere attivata con il tasto SFP e nella fase operativa Process / cartella 3D Visualization and Animation. Se la funzione viene attivata tramite il tasto, l'immagine di proiezione è solo una visualizzazione temporanea su monitor.

& vedi Fase operativa Process / cartella 3 D Visualization and Animation (pagina 286)
& vedi Creare un esperimento (pagina 257)

Segmentazione di strutture immagini

In questo capitolo si trovano i seguenti temi:

- Struttura e controllo della fase operativa Process
- Cosa è la segmentazione nell'elaborazione di immagini?
- Navigazione: Segmentation\ Thresholding
- Navigazione: Segmentation\ Seeding (Threshold)
- Navigazione: Segmentation\ Seeding (Single Channel)
- Navigazione: Segmentation\ Seeding (Cross-Channel)

Struttura e controllo della fase operativa Process

Facendo clic sul simbolo di freccia Process (Processo), la normale struttura dell'interfaccia di comando viene completamente modificata. Tutti i tasti di funzione degli altri campi pulsanti/fasi operative si disattivano. Sul lato sinistro viene mostrata la finestra di visualizzazione Experiment Overview (Panoramica esperimento) **(1)** con gli esperimenti aperti. Più in basso si trova la finestra di navigazione **(2)** con l'albero di directory di tutte le funzioni disponibili in questa fase operativa. Al centro dell'interfaccia di comando compaiono 10 grandi zone pagina **(3)** che comprendono 10 moduli. Al di sopra di queste zone pagina si trova un campo di aiuto **(4)**, dove, tenendo il puntatore su una determinata zona pagina, è possibile visualizzare una breve spiegazione del relativo modulo.

▶	Fare clic sulla zona pagina contenente il modulo desiderato. Ad ogni livello di navigazione, puntando il mouse su una specifica zona pagina, si visualizza una spiegazione dei moduli in alto, nel campo di aiuto.
▶	Nei livelli di navigazione successivi, scegliere ogni volta una zona pagina fino a raggiungere la funzione desiderata con la relativa finestra di dialogo all'ultimo livello.
▶	Nella finestra di navigazione si può scegliere direttamente una funzione facendo clic sulla cartella corrispondente.

Nella riga di menu in alto a destra vengono suggeriti i seguenti tasti **(5)**:

▶	Fare clic sul tasto Back (Indietro) per ritornare all'ultimo livello di navigazione visualizzato.
▶	Fare clic sul tasto Forward (Avanti) per visualizzare il livello che si era selezionato prima di aver azionato con un clic il tasto Back.
▶	Fare clic sul tasto Up (Su) per portarsi al livello gerarchicamente superiore.
▶	Fare clic sul tasto Reset (Ripristina) per riportare le variabili modificate all'ultima impostazione.
▶	Per uscire dalla fase operativa Process (Processo), fare clic sul simbolo di freccia di un'altra fase operativa (per esempio, Acquire).

Nell'estremità inferiore di ogni finestra di dialogo si trovano questi due pulsanti:

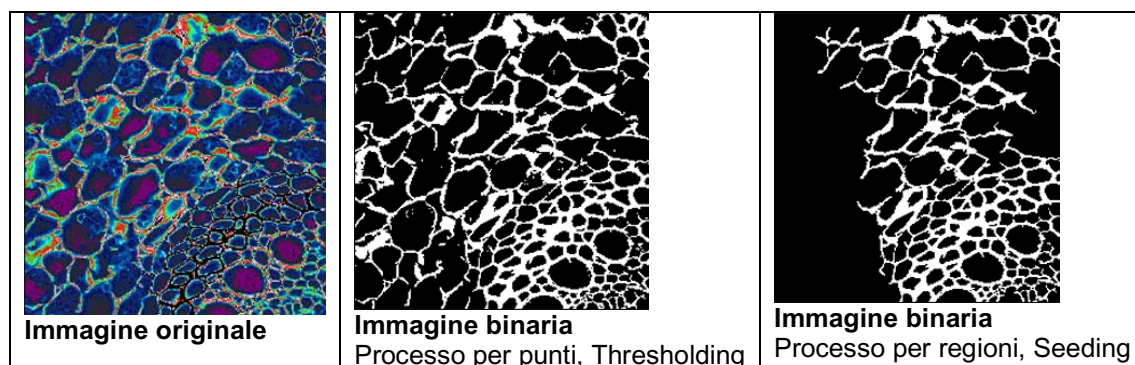
▶	Fare clic sul pulsante Preview (Anteprima) per eseguire la funzione selezionata e visualizzare l'immagine finale a destra, nella finestra di anteprima.

▶	Fare clic sul tasto Apply (Applica) per applicare la funzione selezionata al record di dati immagine attivo, visualizzare l'immagine finale nella finestra di visualizzazione Viewer e creare un nuovo file nell'esperimento attivo.

Cosa è la segmentazione nell'elaborazione di immagini?
Molte applicazioni della microscopia confocale richiedono l'estrazione di alcune strutture di un'immagine, che a loro volta dovranno essere accessibili come insieme per effettuare analisi quantitative. Per separare le informazioni grafiche rilevanti da quelle irrilevanti, si applica il processo di segmentazione. Nel campo dell'elaborazione grafica, segmentazione significa, da un lato, la separazione di sfondo e struttura, dall'altro, la suddivisione di un'immagine in strutture continue. Esiste una tecnica di segmentazione per punti e una segmentazione per regioni.

Il metodo per punti analizza il valore di intensità di un pixel isolato. Con questa tecnica si registra la ripartizione delle intensità di un'immagine in un istogramma e si cerca di trovarvi un valore di soglia. Nel Leica Confocal Software, questo processo viene realizzato con la funzione di «Thresholding» (funzione del valore di soglia). Si può impostare un valore di soglia inferiore e un valore di soglia superiore. Per tutti i pixel il cui valore di intensità rientra nel campo definito dai valori di soglia si registra nell'immagine finale il valore binario 1; per tutti gli altri pixel il valore binario 0. Il risultato è un'immagine binaria con i dati relativi alla struttura rispetto allo sfondo. I pixel codificati come struttura vengono tutti rappresentati con il livello di grigio massimo di 255 (per un'intensità di 8 bit), i pixel codificati come sfondo con il livello di grigio 0.

Al contrario della tecnica per punti, il metodo di segmentazione per regioni considera il fatto che le strutture sono complessi continui. Nel campo dell'elaborazione grafica, significa che ogni pixel deve sempre essere analizzato insieme ai propri pixel adiacenti. Pertanto, determinante per l'identificazione di un pixel come struttura o come sfondo, non è più solo l'osservazione isolata del valore di intensità di un pixel, bensì l'intensità di un pixel nel contesto delle intensità dei pixel adiacenti. Nel Leica Confocal Software, questa tecnica viene realizzata con le funzioni «Seeding» (funzioni di espansione del campo). Partendo da un pixel iniziale (detto anche «pixel seme»), viene controllata la relazione dei valori di intensità tra pixel iniziale e pixel adiacenti. Sulla base di un determinato criterio (per esempio, che l'intensità di un pixel adiacente non può discostarsi di più del 75% dal valore di un pixel seme), si stabilisce quali pixel calcolare nell'immagine finale come struttura (valore binario 1) e quali come sfondo (valore binario 0).

Immagine originale	**Immagine binaria** Processo per punti, Thresholding	**Immagine binaria** Processo per regioni, Seeding

Navigazione: Segmentation\ Thresholding
Segmentazione per punti mediante un valore di soglia
Può essere definito un valore di soglia inferiore e un valore di soglia superiore. L'intensità di ogni pixel nell'immagine viene poi analizzata in termini di appartenenza o non appartenenza a questo campo di valori di soglia. Questo metodo di segmentazione è particolarmente utile quando le strutture nell'immagine non si toccano e si distaccano chiaramente dallo sfondo.

▶	Nella finestra di visualizzazione Experiment Overview (Panoramica esperimento), selezionare il record di dati immagine da elaborare facendo doppio clic sul file.
▶	Nel registro Lower (Inferiore), all'interno del campo Channels (Canali), fissare la soglia inferiore per ogni singolo canale di rilevamento, immettendo un valore compreso tra 0 e 255 (con

	un'intensità di 8 bit) o posizionando il cursore conformemente. Nell'immagine binaria finale, i valori di intensità inferiori a questa soglia vengono impostati a 0.
▶	Nel registro Upper (Superiore), all'interno del campo Channels, fissare la soglia superiore per ogni singolo canale di rilevamento, immettendo un valore compreso tra 0 e 255 (con un'intensità di 8 bit) o posizionando il cursore conformemente. Nell'immagine binaria finale, i valori di intensità superiori a questa soglia vengono impostati a 0.
▶	Nel campo Options (Opzioni), fare clic su Lock Channels (Blocca canali) per fissare lo stesso valore di soglia in tutti i canali di rilevamento.
▶	Se il software deve calcolare un valore di soglia inferiore appropriato, fare clic sul pulsante Suggest (Suggerisci): per questa operazione viene utilizzato l'algoritmo selezionato nel registro Estimation (Calcolo) (vedi di seguito).

Registro Estimation
Entropy Maximisation: calcolo dell'entropia massimale
Condizione fondamentale di questo algoritmo è la premessa dell'esistenza di un rapporto tra la probabilità di un evento e il relativo contenuto informativo. Di conseguenza, gli eventi più frequenti (spesso sfondo) hanno un valore informativo inferiore, mentre gli eventi più rari (spesso struttura) ne hanno uno maggiore. Le intensità dell'immagine vengono suddivise in due insiemi ed analizzate in base al valore di intensità in corrispondenza del quale l'entropia, quindi la probabilità di una sua comparsa, è maggiore. Il valore di soglia ottimale, quindi, è quello per cui la somma delle entropie di entrambi gli insiemi è maggiore o, in altri termini, il contenuto informativo è minore.

Within Group Variance Minimisation: Calcolo del valore minimo della varianza di gruppo
Condizione fondamentale di questo algoritmo è la premessa che in un'immagine si possano trovare due distribuzioni normali di basse intensità da un lato, ed intensità elevate dall'altro, corrispondenti alla struttura e allo sfondo. Per ogni valore di soglia possibile si analizzano i valori di intensità presenti nell'immagine, calcolando due curve di distribuzione normale. Il valore di soglia viene poi collocato tra queste due curve.

Navigazione: Segmentation\ Seeding (Threshold)
Segmentazione per regioni mediante un valore di soglia
L'utente può definire un valore di soglia inferiore e un valore di soglia superiore. Partendo da un pixel iniziale selezionabile, vengono poi analizzate le intensità di tutti i pixel adiacenti in termini di appartenenza o non appartenenza a questo campo di valori di soglia. Se non si trovano altri pixel adiacenti che rientrano in questo campo di valori, l'operazione viene conclusa.

▶	Nella finestra di visualizzazione Experiment Overview (Panoramica esperimento), selezionare il record di dati immagine da elaborare facendo doppio clic sul file.
▶	Nel campo Lower Threshold (Soglia inferiore) fissare il valore di soglia inferiore, nel campo Upper Threshold (Soglia superiore) fissare il valore di soglia superiore, immettendo un valore compreso tra 0 e 255 (con intensità di 8 bit) o posizionando il cursore conformemente. Nell'immagine binaria finale, i valori di intensità al di sopra o al di sotto di questo campo di valori di soglia vengono impostati a 0.
▶	Nel campo Position (Posizione) del campo d'elenco Channels (Canali), selezionare il canale di rilevamento su cui effettuare la segmentazione dei dati immagine. Selezionando l'opzione All (Tutti), la segmentazione viene eseguita separatamente per ogni canale di rilevamento.
▶	Se il record di dati immagine è una serie temporale o una serie lambda, selezionare nel campo d'elenco a destra anche la quarta dimensione, cioè un determinato momento o una determinata lunghezza d'onda.
▶	Posizionare il reticolo nell'immagine per la definizione del pixel iniziale. A tal fine, occorre immettere nel campo Position (Posizione) un valore per le coordinate x, y e z, oppure, con il tasto sinistro del mouse premuto, tirare il reticolo portandolo alla posizione desiderata.

Navigazione: Segmentation\ Seeding (Single Channel)
Segmentazione per regioni in un canale
L'utente può definire una deviazione ammissibile (in percentuale) rispetto all'intensità di un pixel iniziale selezionabile. Partendo da questo pixel iniziale, vengono poi analizzate le intensità di tutti i pixel adiacenti per stabilire se queste differiscono di più del 75%, per esempio, dal valore del pixel

iniziale. Se non si trovano altri pixel adiacenti che rientrano in questo campo di valori tollerabili, l'operazione viene conclusa. Questa operazione viene eseguita separatamente per ogni canale di rilevamento selezionato.

▶	Nella finestra di visualizzazione Experiment Overview (Panoramica esperimento), selezionare il record di dati immagine da elaborare facendo doppio clic sul file.
▶	Nel campo Threshold (Soglia), determinare la deviazione ammissibile in percentuale immettendo un valore o posizionando il cursore conformemente. Nell'immagine binaria finale, i valori di intensità che superano la deviazione definita dal campo di percentuale, vengono impostati a 0.
▶	Nel campo Position (Posizione) del campo d'elenco Channels (Canali), selezionare il canale di rilevamento su cui effettuare la segmentazione dei dati immagine. Selezionando l'opzione All (Tutti), la segmentazione viene eseguita separatamente per ogni canale di rilevamento.
▶	Se il record di dati immagine è una serie temporale o una serie lambda, selezionare nel campo d'elenco a destra anche la quarta dimensione, cioè un determinato momento o una determinata lunghezza d'onda.
▶	Posizionare il reticolo nell'immagine per la definizione del pixel iniziale. A tal fine, occorre immettere nel campo Position (Posizione) un valore per le coordinate x, y e z, oppure, con il tasto sinistro del mouse premuto, tirare il reticolo portandolo alla posizione desiderata.

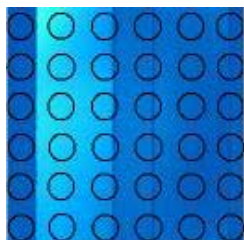
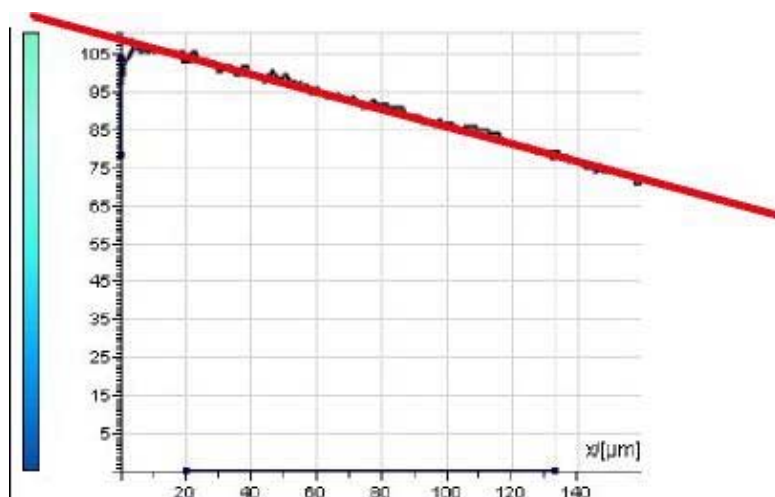
Navigazione: Segmentation\ Seeding (Cross-Channel)
Segmentazione per regioni su tutti i canali
L'utente può definire una deviazione ammissibile (in percentuale) rispetto all'intensità di un pixel iniziale selezionabile. Partendo da questo pixel iniziale, vengono poi analizzate le intensità di tutti i pixel adiacenti per stabilire se queste differiscono di più del 75%, per esempio, dal valore del pixel iniziale. Se non si trovano altri pixel adiacenti che rientrano in questo campo di valori tollerabili, l'operazione viene conclusa. A differenza della precedente funzione «Seeding (Single Channel)», qui l'operazione viene eseguita contemporaneamente su tutti i canali di rilevamento.

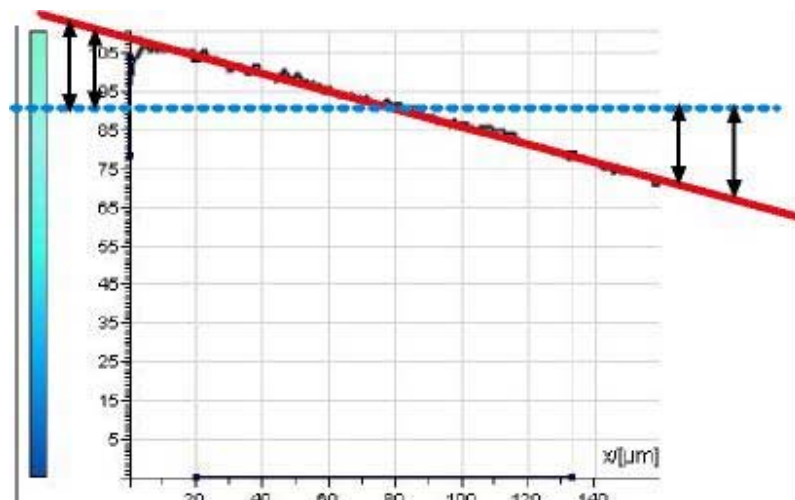
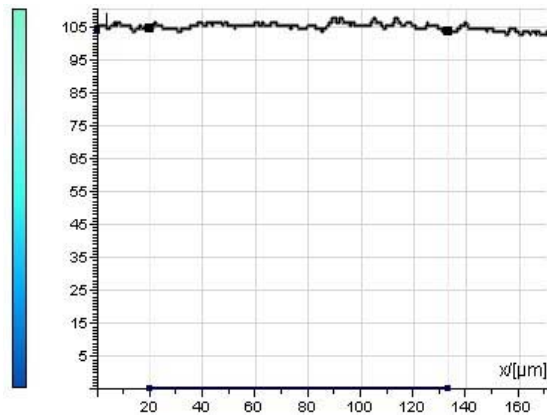
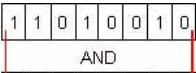
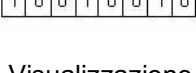
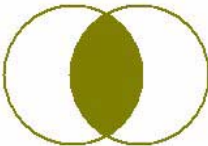
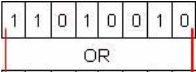
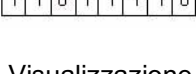
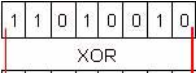
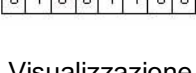
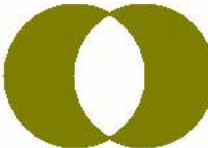
▶	Nella finestra di visualizzazione Experiment Overview (Panoramica esperimento), selezionare il record di dati immagine da elaborare facendo doppio clic sul file.
▶	Nel campo Threshold (Soglia), determinare la deviazione ammissibile in percentuale immettendo un valore o posizionando il cursore conformemente. Nell'immagine binaria finale, i valori di intensità che superano la deviazione definita dal campo di percentuale, vengono impostati a 0.
▶	Nel campo Position (Posizione) del campo d'elenco Channels (Canali), l'opzione All (Tutti) è fissa. Se il record di dati immagine è una serie temporale o una serie lambda, selezionare nel campo d'elenco a destra anche la quarta dimensione, cioè un determinato momento o una determinata lunghezza d'onda.
▶	Posizionare il reticolo nell'immagine per la definizione del pixel iniziale. A tal fine, occorre immettere nel campo Position (Posizione) un valore per le coordinate x, y e z, oppure, con il tasto sinistro del mouse premuto, tirare il reticolo portandolo alla posizione desiderata.

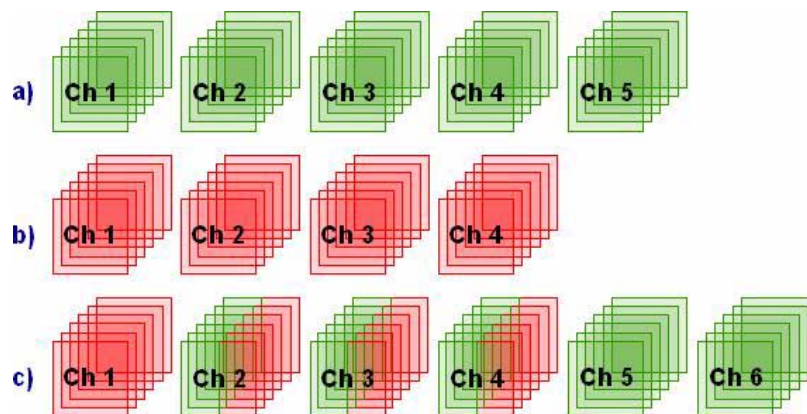
Appendice

Funzione di adattamento per la correzione di andamenti tendenziali

& vedi Fase operativa Process / cartella Materials (pagina 268)

1. Selezione dell'ampiezza dell'intervallo, cioè della distanza dei nodi di interpolazione

2. Selezione del carattere della funzione di interpolazione da adattare

3. Calcolo della funzione di interpolazione f(x) = a + bx + cy

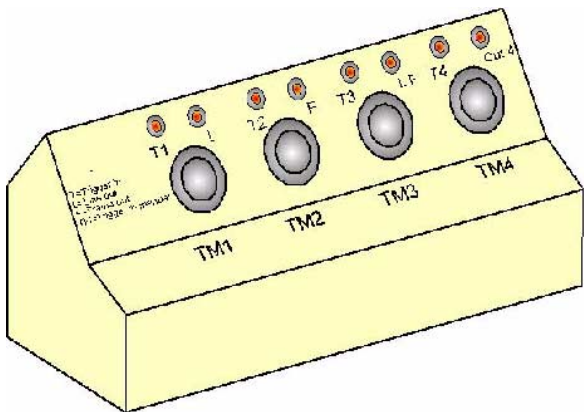
4. Addizione delle differenze di intensità per la compensazione dell'andamento tendenziale

prima della compensazione

dopo la compensazione

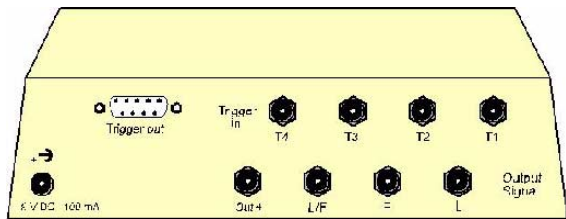
Esempio di raggruppamento di immagini con differente numero di canali (Merging)

a.) Prima immagine in uscita (impostazione: Start=2)
b.) Seconda immagine in uscita (impostazione: Start=1)
c.) Immagine di unione

Modalità di funzionamento delle operazioni booleane

AND	Scrive 1 quando c'è un 1 nel pixel 1 E nel pixel 2, altrimenti scrive 0	a.) 1 1 0 1 0 0 1 0 AND b.) 1 0 0 1 1 1 1 0 c.) 1 0 0 1 0 0 1 0 a.) Visualizzazione binaria pixel 1 b.) Visualizzazione binaria pixel 2 c.) Visualizzazione binaria pixel finale	AND visualizza l'insieme di sezioni di due immagini
OR	Scrive 1 quando c'è un 1 nel pixel 1 O nel pixel 2, altrimenti scrive 0	a.) 1 1 0 1 0 0 1 0 OR b.) 1 0 0 1 1 1 1 0 c.) 1 1 0 1 1 1 1 0 a.) Visualizzazione binaria pixel 1 b.) Visualizzazione binaria pixel 2 c.) Visualizzazione binaria pixel finale	OR visualizza l'insieme di unione di due immagini
XOR	Scrive 1 quando i valori nel pixel 1 e nel pixel 2 sono diversi, altrimenti scrive 0	a.) 1 1 0 1 0 0 1 0 XOR b.) 1 0 0 1 1 1 1 0 c.) 0 1 0 0 1 1 0 0 a.) Visualizzazione binaria pixel 1 b.) Visualizzazione binaria pixel 2 c.) Visualizzazione binaria pixel finale	XOR visualizza l'insieme di unione senza l'insieme di sezioni di due immagini.

Pannello di comando opzionale di attivazione

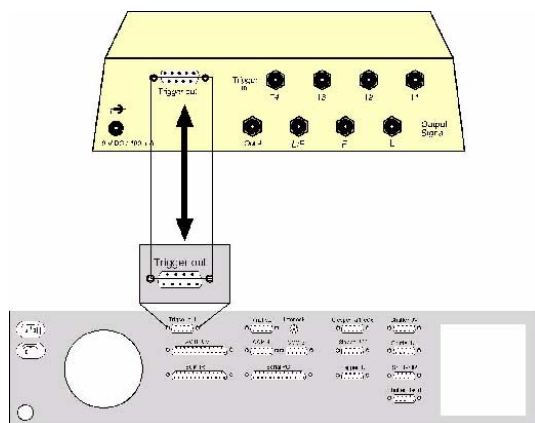
Descrizione della funzione
Il pannello di comando opzionale di attivazione serve per controllare i segnali di attivazione in entrata e in uscita. I segnali di attivazione possono inoltre essere attivati manualmente per il comando di sequenze di ripresa.
Il pannello di comando può essere ordinato sotto il numero articolo 156108330 presso la filiale Leica di competenza.

Parte frontale del pannello di comando di attivazione

Elemento	Funzione
T1	Spia del segnale: indica se un segnale di attivazione è stato attivato manualmente sul canale di attivazione 1, o se un segnale di attivazione esterno è in entrata attraverso il collegamento T1 (parte posteriore della console di comando)
T2	Spia del segnale: indica se un segnale di attivazione è stato attivato manualmente sul canale di attivazione 2, o se un segnale di attivazione esterno è in entrata attraverso il collegamento T2 (parte posteriore della console di comando)
T3	Spia del segnale: indica se un segnale di attivazione è stato attivato manualmente sul canale di attivazione 3, o se un segnale di attivazione esterno è in entrata attraverso il collegamento T3 (parte posteriore della console di comando)
T4	Spia del segnale: indica se un segnale di attivazione è stato attivato manualmente sul canale di attivazione 4, o se un segnale di attivazione esterno è in entrata attraverso il collegamento T4 (parte posteriore della console di comando)
Out4	Spia del segnale: si accende se un segnale di attivazione diretto verso l'esterno è stato inviato attraverso il canale di attivazione 4 (Segnale TTL standard)
L	Spia del segnale: indica il segnale di riga. Questa spia si accende durante l'intero periodo in cui vengono ripresi dati in una scansione per righe.
F	Spia del segnale: indica il segnale di quadro. Questa spia si accende durante l'intero periodo in cui viene ripreso un fotogramma (frame).
L/F	La porta logica AND tra il segnale di riga L e il segnale di quadro F
TM1	Tasto: l'azionamento di detto tasto genera un segnale di attivazione sul canale di attivazione 1. Questo segnale può essere rilevato ed elaborato dal sistema confocale.
TM2	Tasto: l'azionamento di detto tasto genera un segnale di attivazione sul canale di attivazione 2. Questo segnale può essere rilevato ed elaborato dal sistema confocale.
TM3	Tasto: l'azionamento di detto tasto genera un segnale di attivazione sul canale di attivazione 3. Questo segnale può essere rilevato ed elaborato dal sistema confocale.
TM4	Tasto: l'azionamento di detto tasto genera un segnale di attivazione sul canale di attivazione 4. Questo segnale può essere rilevato ed elaborato dal sistema confocale.

Parte posteriore del pannello di comando di attivazione

Elemento	Funzione

Trigger out	Presa di collegamento per la connessione con la presa "Trigger out" sulla parte posteriore dell'unità alimentazione
9V DC / 100 mA	Alimentazione del pannello di comando di attivazione
T1	Collegamento per segnali di attivazione in entrata (5V, 100msec, 2,2 kOhm)
T2	Collegamento per segnali di attivazione in entrata (5V, 100msec, 2,2 kOhm)
T3	Collegamento per segnali di attivazione in entrata (5V, 100msec, 2,2 kOhm)
T4	Collegamento per segnali di attivazione in entrata (5V, 100msec, 2,2 kOhm)
Out4	Collegamento attraverso il quale viene emesso un segnale di attivazione (standard TTL) generato dal sistema confocale
L	Segnale di riga. Questo segnale si trova ad "1" logico durante tutto il periodo in cui vengono ripresi dati in una scansione per righe.
F	Segnale di quadro. Questo segnale si trova ad "1" logico durante tutto il periodo in cui vengono ripresi dati in un fotogramma (frame).
L/F	La porta logica AND tra il segnale di riga L e il segnale di quadro F

Installazione
Il pannello di comando di attivazione va collegato al sistema confocale nel modo seguente:

1. Il cavo piatto accluso alla fornitura va connesso alla presa di collegamento "Trigger out" sulla parte posteriore del pannello di comando, e all'omonima presa di collegamento sulla parte posteriore dell'unità alimentazione.

2. Il pannello di comando di attivazione va collegato al componente di rete acclusa alla fornitura, e il componente di rete va collegato a 230 V ca.

Applicazione
Tramite cavi BNC è possibile trasmettere segnali di attivazione esterni (prese di collegamento "T1"-"T4") tramite il pannello di comando di attivazione al sistema confocale.
I segnali di attivazione in uscita possono essere inviati ad apparecchi tramite la presa di collegamento "Out4".
Per verifica è possibile utilizzare i tasti "TM1" - "TM4".

Glossario

Aberrazione, cromatica	*Errore ottico di rappresentazione determinato dalla diversa rifrazione dei raggi luminosi di una lunghezza d'onda differente su una lente. In tal modo i raggi luminosi di lunghezza d'onda minore hanno una distanza focale maggiore rispetto ai raggi luminosi aventi una lunghezza d'onda maggiore.*
Aberrazione, sferica	*Errore ottico di visualizzazione determinato dalla diversa distanza di raggi luminosi parassiali della stessa lunghezza d'onda rispetto all'asse ottico. I raggi luminosi che attraversano le zone esterne della lente hanno una distanza focale minore rispetto ai raggi che attraversano il centro della lente (asse ottico).*
Acromatico	*Classe di correzione di un obiettivo. Con obiettivi di questo tipo, si corregge l'aberrazione cromatica per due lunghezze d'onda. Normalmente un obiettivo simile viene regolato ad una lunghezza d'onda inferiore a 500nm e superiore a 600nm. Anche la condizione del seno per una lunghezza d'onda è soddisfatta. La convessità del campo d'immagine non viene corretta.*
Aliasing	*Errore di rappresentazione che si presenta quando il tasso di scansione riferito alla frequenza di un segnale è troppo basso.*
AOTF **Acousto-Optical Tunable Filter**	*Il filtro acusto-ottico regolabile è un cristallo ottico trasparente che può essere regolato in modo continuo con l'intensità e la lunghezza d'onda della luce irradiata. Nel cristallo si crea un campo di onde ultrasoniche la cui lunghezza d'onda può essere regolata a piacere. La luce irradiata perpendicolare al campo di onde ultrasoniche viene rifratta come su un reticolo.*
Apertura, numerica	*L'apertura è il seno dell'angolo di apertura al di sotto della luce nella lente frontale all'ingresso di un obiettivo per microscopio; sigla NA. Oltre all'intensità luminosa, l'apertura influenza anche il potere risolutivo di un obiettivo ottico. Visto che tra preparato e obiettivo possono esserci diversi elementi (ad esempio, l'elemento incorporato del preparato), l'apertura numerica ($NA = n * \sin \alpha$) viene normalmente utilizzata come unità di misura per l'intensità luminosa e il potere risolvente.*
Apocromatico	*Classe di correzione di un obiettivo. Con obiettivi di questo tipo, si corregge l'aberrazione cromatica per tre lunghezze d'onda (perlopiù 450nm, 550nm e 650nm) e viene soddisfatta la condizione del seno per almeno due colori. La convessità del campo d'immagine non viene corretta.*
Bi-dicroite	*I filtri bi-dicroici sono filtri interferenziali ad un angolo di incidenza della luce di 45°. La trasmissività o la riflessività delle bi-dicroiti dipende da due determinate lunghezze d'onda della luce. Con una* ***d****oppia* ***d****icroite DD 488/568 per esempio, la luce di eccitazione viene riflessa tra 488 nm e 568 nm e trasmessa al di sopra di questi valori. I valori di trasmissione si trovano normalmente all'80%, i valori di riflessione sono compresi tra il 90% e il 95%.*
Confocalità	*Mentre il progetto di un microscopio convenzionale prevede la rilevazione indistinta di componenti dell'immagine nitidi e non nitidi, il principio confocale implica la soppressione delle strutture esterne al piano ottico dell'obiettivo da microscopio. Questa è la funzione dei diaframmi, usati nei punti otticamente coniugati del percorso del raggio. Essi fungono da sorgente luminosa di punti (diaframma di eccitazione) e da rivelatore di punti (diaframma di rilevamento). Il diametro del diaframma di rilevamento determina, oltre alla lunghezza d'onda e all'apertura numerica dell'obiettivo usato, anche l'espansione assiale di una sezione ottica (risoluzione ottica).*
Convessità del campo d'immagine	*La superficie convessa su cui viene rappresentata un'immagine microscopica nitida è definita convessità del campo d'immagine. Questa è determinata dalla forma convessa della lente e, date le scarse lunghezze focali degli obiettivi da microscopio, si mostra come un errore. Pertanto l'oggetto non viene rappresentato nitidamente al centro e in periferia in contemporanea. Gli obiettivi che presentano una correzione relativa alla convessità del campo d'immagine, si chiamano obiettivi piani (piano =*

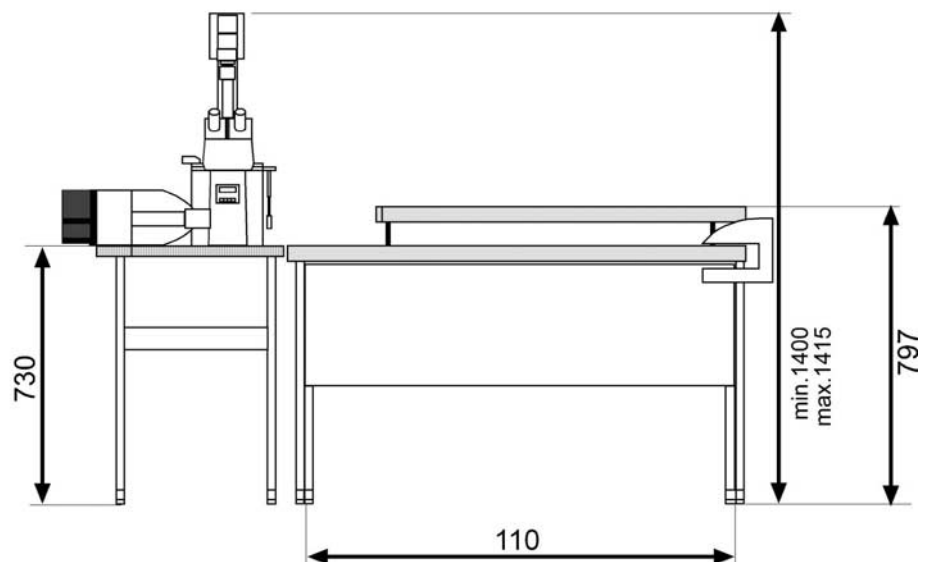
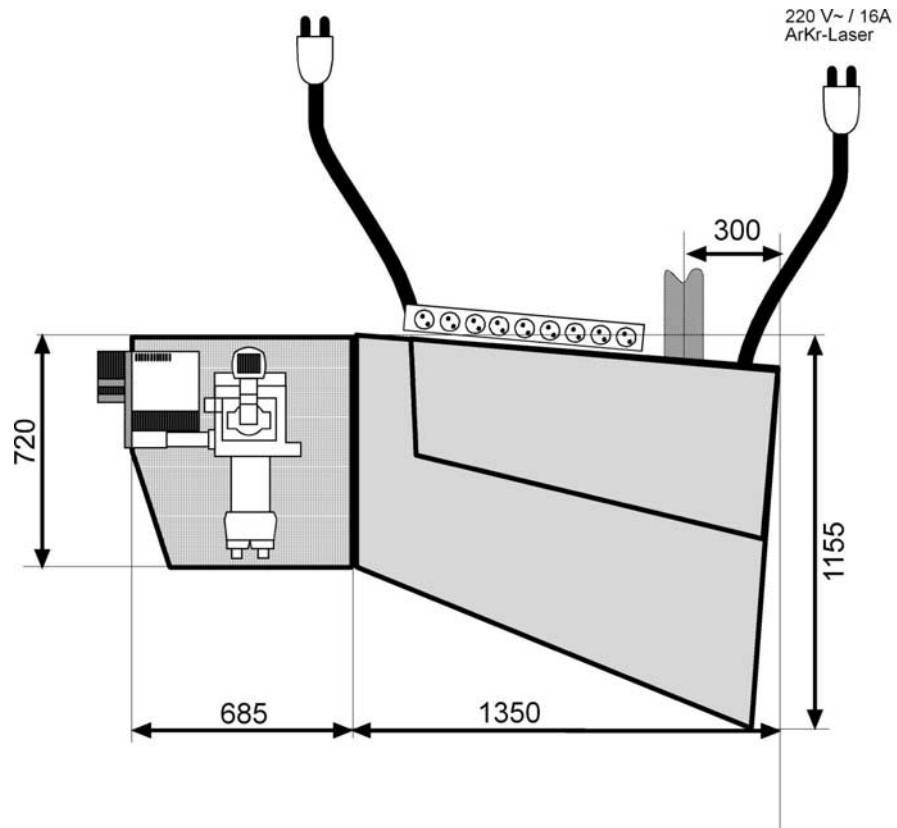
	campo d'immagine piano).
Dicroite	*I filtri dicroici sono filtri interferenziali ad un angolo di incidenza della luce di 45°. La trasmissività o la riflessività delle dicroiti dipende da una determinata lunghezza d'onda della luce. Con un filtro passacorto* ***RSP*** *510 (**r**eflection **s**hort **p**ass), per esempio, la luce di eccitazione viene riflessa al di sotto di 510 nm e trasmessa al di sopra di questo valore. I valori di trasmissione sono normalmente compresi tra l'80% e il 90%, i valori di riflessione tra il 90% e il 95%.*
Disco di Airy	*Con disco di Airy si definisce il cerchio luminoso interno (circondato da anelli di diffrazione alternativamente chiari e scuri) dell'immagine di diffrazione di una sorgente luminosa puntiforme. I dischi di diffrazione di due punti oggetto vicinissimi l'uno all'altro si sovrappongono parzialmente o del tutto, limitando così il potere risolvente spaziale.*
Distanza di lavoro	*Distanza della lente frontale di un obiettivo rispetto al fuoco. Con una distanza di lavoro libera, viene indicata la distanza tra la lente frontale dell'obiettivo e il vetrino oppure rispetto al campione scoperto. Di norma gli obiettivi con una ampia distanza di lavoro possiedono un'apertura numerica ridotta, viceversa obiettivi con un'ampia apertura hanno una distanza di lavoro minima. Per avere un obiettivo di ampia apertura con una grande distanza di lavoro, il diametro delle lenti dell'obiettivo deve essere altrettanto grande. Nella maggior parte dei casi di tratta comunque di ottiche poco corrette, in quanto il rispetto delle estreme esattezze di produzione attraverso un ampio diametro della lente si rivela difficoltoso.*
Filtro, digitale, per fase	*Un filtro digitale consta di una regola aritmetica in base alla quale si possono modificare i dati immagine. Con i filtri si cerca sempre di rimuovere i componenti di disturbo dell'immagine. Un filtro per fase garantisce che, attraverso la filtrazione, grandezze d'immagine quantificabili rimangano invariate e quindi rappresenta una condizione per i metodi di misurazione standardizzati (per esempio, caratterizzazione di superfici secondo la norma ISO).*
Filtro neutro	*I filtri neutri sono lastrine di vetro parzialmente rivestite di specchi che servono alla ripartizione del percorso del raggio a prescindere dalla lunghezza d'onda. La luce incidente viene in parte riflessa e in parte trasmessa. I filtri neutri sono normalmente impostati nel percorso del raggio ad un angolo inferiore ai 45°. I dati caratteristici di un filtro neutro si riferiscono al rapporto tra riflessività e trasmissività. Con un filtro neutro* ***RT*** *30/70, per esempio, viene **r**iflesso il 30% e **t**rasmesso il 70% della luce di eccitazione.*
Filtro passa-corto	*I filtri passa-corto sono filtri interferenziali che trasmettono luce a onde corte, ma riflettono luce a onde lunghe. Il filtro ottico passa-corto è caratterizzato dall'indicazione del margine della lunghezza d'onda, in corrispondenza del quale il filtro passa da trasmissione a riflessione (50% della soglia).*
Filtro passa-lungo	*I filtri passa-lungo sono filtri interferenziali che riflettono luce ad onda corta e sono trasparenti per la luce ad onda lunga. Un filtro passa-lungo è caratterizzato dall'indicazione del margine della lunghezza d'onda, in corrispondenza del quale il filtro passa da riflessione a trasmissione (50% della soglia).*
Frame	*Un frame equivale ad una ripresa di una singola sezione ottica. Se, ad esempio, una singola sezione ottica viene ripresa quattro volte (per calcolare la media dei dati ed eliminare i disturbi), si creano 4 frame per la sezione ottica in questione.*
Imbianchimento, ottico	*Distruzione dei coloranti fluorescenti, i cosiddetti fluorocromi, in seguito ad un'illuminazione intensiva. Nella microscopia a fluorescenza, i fluorocromi vengono portati con la luce laser ad uno stato energetico elevato, lo stato singoletto. Se le molecole eccitate ritornano al loro stato normale, viene emesso un segnale fluorescente. Con un'eccitazione troppo intensa, le molecole di colorante possono anche passare, tramite un intercrossing, da uno stato singoletto ad uno stato tripletto. Data la durata notevolmente maggiore degli stati tripletto (fosforescenza), queste molecole eccitate*

	possono reagire chimicamente con l'ossigeno tripletto, diventando inutilizzabili per un'altra eventuale attivazione di fluorescenza.
Indice di rifrazione	*Fattore per il quale la velocità della luce in un mezzo ottico è minore rispetto a quella nel vuoto.*
Ingrandimento a vuoto	*Ingrandimento senza acquisizione di altre informazioni. Si parla di ingrandimento a vuoto quando vengono visualizzate distanze minori del potere risolvente ottico. Ingrandimenti con una scala maggiore rispetto a quella dell'ingrandimento a vuoto non fanno emergere ulteriori informazioni sull'oggetto, bensì peggiorano soltanto la nitidezza dell'immagine e il contrasto.*
Microscopia a fluorescenza	*Procedimento ottico a contrasto per la rappresentazione di strutture fluorescenti. I campioni autofluorescenti sono dotati di una cosiddetta fluorescenza primaria e non hanno bisogno di essere arricchiti con ulteriori sostanze fluorescenti. Al contrario, le sostanze fluorescenti secondarie devono anzitutto essere integrate con coloranti appropriati, i cosiddetti fluorocromi. Le colorazioni specifiche consentono l'esatta localizzazione degli elementi strutturali tinti di un oggetto. La microscopia a fluorescenza offre sia il potenziale di analisi morfologiche, sia la possibilità di effettuare analisi dinamiche a livello molecolare.*
Obiettivo a secco	*Obiettivo microscopico usato senza mezzi di immersione. Tra la lente dell'obiettivo e il preparato si trova aria.*
Obiettivo ad immersione	*Obiettivo da microscopio, sviluppato nella condizione di impiego di mezzi di immersione. Se con un obiettivo ad immersione si utilizza un mezzo di immersione non adatto o non ne si utilizza alcuno, si possono avere perdite di risoluzione e peggioramenti della correzione.*
Obiettivi alla fluorite	*Classe di correzione di un obiettivo. Gli obiettivi alla fluorite sono obiettivi semiapocromatici, quindi nel loro grado di correzione si trovano tra gli obiettivi acromatici e quelli apocromatici.*
Obiettivi piani	*Classe di correzione di un obiettivo. Con obiettivi di questo tipo viene corretta la convessità del campo immagine. L'eliminazione di questo errore richiede lenti dotate di superfici concave più forti e uno spessore centrale maggiore. A seconda del tipo di aberrazione cromatica ulteriormente corretta, si distinguono gli obiettivi acromatici piani, gli obiettivi apocromatici piani e gli obiettivi alla fluorite piani*
Pixel	*Termine tecnico che deriva dalle parole inglesi pic*ture *(immagine) e el*ement *(elemento). Un pixel è il punto grafico più piccolo e indivisibile in un sistema bidimensionale. In questa documentazione, viene denominato pixel sia un punto di scansione del preparato sia un punto grafico.*
Rapporto segnale/disturbo	*Il rapporto tra i segnali rilevati nel preparato e i segnali indesiderati, casualmente provocati da diversi componenti ottici ed elettronici che vengono poi acquisiti indistintamente dal rivelatore.*
ROI	*Questa abbreviazione sta per "Region of Interest" (regione di interesse). Un ROI definisce un ambito per il quale deve avvenire una analisi di calcolo. Un ROI può anche indicare la zona di un campione da sottoporre a scansione (ROI-Scan).*
Spostamento di Stokes	*Lo spostamento di Stokes è un concetto essenziale nella microscopia a fluorescenza. Quando le molecole fluorescenti vengono eccitate con la luce di una determinata lunghezza d'onda, esse irradiano luce di una lunghezza d'onda diversa e maggiore. Questa differenza tra luce di eccitazione e luce fluorescente viene definita spostamento di Stokes. Senza lo spostamento di Stokes, non sarebbe possibile dividere la luce di eccitazione ad alta intensità dai segnali di fluorescenza a bassa intensità in un microscopio a fluorescenza.*
Tricroite	*I filtri tricroici sono filtri interferenziali ad un angolo di incidenza della luce di 45°. La trasmissività e la riflessività delle tricroiti dipende da tre determinate lunghezze d'onda della luce. Con una* **t***ripla* **d***icroite TD 488/568/647, per esempio, la luce di eccitazione viene riflessa a 488 nm, 568 nm e 633nm, e trasmessa al di sopra di questo valore. I valori di trasmissione si trovano normalmente all'80%, i valori di riflessione sono compresi tra il 90% e il 95%.*

Visualizzazione di fase	*Il principio della visualizzazione di fase, così come viene inteso da Leica, è un metodo alternativo ottimizzato alle visualizzazioni raziometriche. Il principale campo di applicazione è rappresentato dalla misurazione di concentrazioni di ioni nella fisiologia. Rispetto al procedimento raziometrico, la visualizzazione di fase contiene maggiori informazioni sul campione. Inoltre, questo metodo consente di adattare la rappresentazione di dati fisiologici alla dinamica dell'occhio umano. Per informazioni più dettagliate sul principio della visualizzazione di fase, si può rivolgersi direttamente alla Leica Microsystems Heidelberg GmbH.*
Voxel	*Termine tecnico che deriva dalle parole inglesi volume (volume) e pixel. Un voxel è l'elemento di volume più piccolo e indivisibile in un sistema tridimensionale. In questa documentazione, si definisce voxel sia un elemento di volume del preparato sia un punto grafico tridimensionale.*

Specifiche

Misure e dimensioni del Leica TCS SP2

Stativo inverso:

Misure e dimensioni del sistema confocale Leica TCS SP2 (tutte le misure in mm)

Dichiarazione di conformità

EC Declaration of Conformity

Leica MICROSYSTEMS

Manufacturer: *Leica Microsystems Heidelberg GmbH*

Address: *Am Friedensplatz 3*
Germany, 68165 Mannheim

Product: ***TCS SP2 Confocal Laser Scanning Microscope***

Option: AOBS, RS

We declare that the product described herein complies with the following European Directives:

89/336/EEC Directive on Electromagnetic compatibility

73/23/EEC Directive on Low-voltage equipment

The product conforms to the standards:

EN 61326-1: 1997 + EN 61326/A1: 1998
EMC requirements for Class A electrical equipment for measurement, control and laboratory use

EN 61000-3-2: 2000
Electromagnetic compatibility (EMC)
Part 3-2: Limits – Limits for harmonic current emissions

EN 61000-3-3: 1995
Electromagnetic compatibility (EMC)
Part 3: Limits – Section 3: Limitation of voltage fluctuations and flicker in low-voltage supply systems for equipment with rated current ≤ 16A

EN 61010-1: 1993 + A2:1995
Safety requirements for electrical equipment for measurement, control and laboratory use; Part 1: General requirements

EN 60825-1: 1994 + A11: 1996 + A2: 2001
Safety of laser products
Part 1: Equipment classification, requirements and user's guide

Manager Research & Development

Mannheim, Germany
January 01, 2002

Dr. Rafael Storz

Indice